



N°/__/__/__/__/__/__/__/__/__/__/__/

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech)

Spécialité :

présentée et soutenue publiquement
par

Bastien PELLET

le 11 décembre 2009

FACTEURS DE CONTROLE DE LA CONTAMINATION D'UN ORGANISME MODELE EN MILIEU AQUATIQUE MULTICONTAMINE

BIODYNAMIQUE DU CADMIUM CHEZ *GAMMARUS PULEX* (LINNAEUS, 1758)

Directeur de thèse : ***Marie-Hélène TUSSEAU-VUILLEMIN***

Travail réalisé : Cemagref, UR Hydro-systèmes et Bioprocédés, BP 44 92163 Antony

Devant le jury :

M.	Bertrand	Ney	Professeur	AgroParisTech	Président
M.	Jean	Prygiel	Professeur associé	Univ. Lille	Rapporteur
M.	Alain	Geffard	Maître de Conférences-HDR	Univ. Reims Champagne-Ardenne	Rapporteur
M.	Michel	Meybeck	Professeur	Univ. Paris VI	Examinateur
M.	Jean-Claude	Amiard	Professeur	Univ. Nantes	Examinateur

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech) est un Grand Etablissement dépendant du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, composé de l'INA PG, de l'ENGREF et de l'ENSIA (décret n° 2006-1592 du 13 décembre 2006)

Facteurs de contrôle de la contamination d'organismes modèles en milieu aquatique multicontaminé

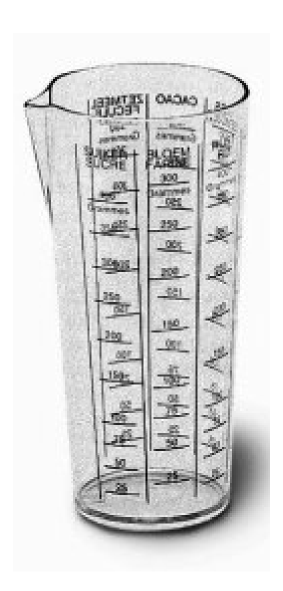
Rapport de thèse

Bastien Pellet

Dédicace

"Ça sera bien utile quand on en aura besoin"

David, janvier 2009



RESUME

Afin d'estimer l'impact des microcontaminants des cours d'eau périurbains sur les écosystèmes, nous relions cette contamination à la réponse d'un organisme modèle, *Gammarus pulex*, en termes de bioaccumulation. La biodisponibilité des contaminants dépend de facteurs de contrôle physico-chimiques et biologiques. Nous visons à les mettre en évidence et à en modéliser l'influence dans le cas du Cd et du benzo[a]pyrène (B[a]P).

En milieu minéral, les influx de bioaccumulation par voie dissoute en Cd ont été proportionnels à la concentration en Cd dissous, ce qui a permis le calibrage d'un modèle biodynamique. En présence de ligands organiques (par ex. des acides humiques), les influx ont suivi linéairement la concentration en métal labile (et non dissous), mesurée par la technique du gradient de diffusion en couches minces. La compétition par les ions Ca^{2+} (inhibition) et, dans une moindre mesure, la température (effet positif) modulent la voie dissoute d'entrée du Cd. Un modèle de type michaelien a rendu compte de l'effet de la dureté calcique de l'eau sur la cinétique d'accumulation du Cd. Par ailleurs, dans le cas du B[a]P, une (probable) métabolisation a été mise en évidence, ce qui complique l'élaboration d'un modèle de bioaccumulation.

Un nouveau protocole de quantification de l'assimilation des métaux via l'alimentation chez les invertébrés, a été adapté au cas de *G. pulex*. Il repose sur un suivi des ratios et des quantités de traceurs (isotopes stables des métaux) dans les feuilles consommées, les gammares et leurs fèces. Entre 6 et 40% du Cd (23% en moyenne) et environ 6% du Cu dans l'alimentation traverse la paroi digestive. Les liens établis entre la contamination du milieu et la bioaccumulation devraient permettre l'utilisation des gammares en biosurveillance.

La bioaccumulation du Cd et du Zn dans des gammares transplantés en site contaminé a été modélisée. En Cd, la confrontation des prévisions aux observations a soulevé la question de la prise en compte de la voie trophique. Enfin, les teneurs dans les gammares autochtones ont été interprétées différemment selon les métaux : celles en Cd et Ni varient entre les sites et dans le temps, celles en Cu et Zn varient beaucoup moins, ce qui semble proscrire leur utilisation en biosurveillance de la contamination chronique du milieu aquatique.

Mots clefs : bioaccumulation, Cd, B[a]P, biodisponibilité, Gradient de diffusion en couche mince (DGT), biosurveillance, *Gammarus pulex*

ABSTRACT

The link between a given contamination and the subsequent bioaccumulation in a model species, Gammarus pulex, has been investigated in order to evaluate the impact of the contamination of freshwaters in micropollutants, in the context of urban areas. Bioavailability depends on biological factors and on the water geochemistry. Our aim is to unravel the influence of such factors on the bioaccumulation process.

In mineral freshwater, Cd toxicocinetic determinations were performed. The rate constant of dissolved uptake (k_u) and the depuration rate (k_e) of benzo[a]pyrene (B[a]P) and Cd were assessed. To some extent, the B[a]P seemed to be metabolized by this amphipod. Hence, further developments of the biodynamic model were not engaged for that compound. In presence of a sufficient amount of humic organic matter, predicted Cd influxes matched better measured influxes when the model predictions were based on the labile concentration (vs. dissolved) measured by the Diffusive Gradients in Thin-films technique (DGT). Consequently, the DGT provides a means of taking into account the influence of metal complexation by the dissolved organic matters on the dissolved uptake. Furthermore, we tested to what extent the uptake clearance rate depends on temperature and on calcium levels. A series of short term experiments proved that increasing the calcium concentration lowers the uptake rate by a factor five whereas temperature had a weaker influence on it.

As far as dietborne uptake of metals is concerned, a pulse-chase feeding protocol was adapted to *G. pulex*, using Cd, Cu and Cr stable isotopes as tracers of the food contamination, during the digestion process. This amphipod assimilates approximately 23% of the Cd (between 6 and 40%) and 6% of the Cu of alder leaves labeled with stable isotopes.

Finally, field experiments were conducted to assess the feasibility of metal biomonitoring with *G. pulex*. In tranplanted gammarids, Cd and Zn bioaccumulation has been modeled as a function of the labile concentration, which points out the need to take dietborne uptake of Cd into account. The spacial and temporal variabilities of the metal concentrations in indigenous gammarids depend on the metal. Temporally and spatially, Cd and Ni gammarid body burdens showed high variabilities whereas Cu and Zn body burdens were rather constants. Thus, Cd and Ni appeared as metals of interest for biomonitoring purposes in the context of low chronic contamination of aquatics environments, and not Cu and Zn.

Keywords: bioaccumulation, Cd, B[a]P, bioavailability, Diffusive Gradients in Thin-films (DGT),

biomonitoring, *Gammarus pulex*

REMERCIEMENTS : MERCI AUX QUARANTE ET UN CONTRIBUTEURS

Je tiens à remercier Gildas Le Bozec et Cécile Loumagne, d'avoir dirigé l'unité de recherche hydro-systèmes et bioprocédés durant ma thèse. Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, Emmanuelle Kuhn et Catherine Gourlay-Francé ainsi que Sophie Ayrault et Olivier Geffard sont les personnes qui m'ont le plus aidé, dans mon organisation et au travers d'échanges scientifiques. Les résultats doivent beaucoup aux efforts de Céline Lacour, Thomas Kermoal et Zahra Zemmouchi, qui ont contribué au projet le temps de leur master de recherche.

Merci Claude Amiard-Triquet de m'avoir suppléé pour donner la conférence au congrès mondial de la Société d'écotoxicologie SETAC en août 2008 et à Marie-Noële Croteau de son aide. J'exprime ma reconnaissance à : Alain Vidal qui a accordé des crédits pour la mission en Californie, Marie Sylvestre qui a produit les cartes de contamination en métaux en Ile-de-France, Raymond Codina qui a trafiqué le filet Surber pour le rendre plus maniable, Karyn LeMenach, Laurent Peluhet et Marie-Hélène Devier qui m'ont formé et aidé à Bordeaux au protocole d'analyse des HAP, et enfin à Corinne Brosse et Raphaël Mons qui m'ont aidé dans les protocoles et à Mohamed Saad qui a prêté du temps d'analyse en ICP-AES.

Merci à ceux qui ont consacré du temps pour favoriser de près ou de loin notre projet : Hélène Budzinski et Jean-Marie Mouchel (tous deux, bien qu'opérant de loin, ont posé des questions utiles), Daniel Ferreira, Alain Geffard, Jeanne Garric, Marina Coquery, Samuel Luoma, Claude Millier et Philippe Duchène. Je remercie ces personnes de m'avoir suggéré des idées. Merci à Vincent Felten, Philip Rainbow et Brian Smith, pour m'avoir enseigné les bases de la biologie des métaux dans les invertébrés lors du stage au Muséum d'Histoire Naturelle de Londres et de visites au Cemagref de Lyon. Manuel Sarraza et Fabrice Martinet à l'Agence de l'Eau Seine-Normandie ont agi en notre faveur en nous confiant des données.

Merci enfin à Sophie Morin et Valérie Dansin, dont la réactivité facilite le travail de recherche, à Daniel Mira pour m'avoir accompagné en campagne terrain, à Isabelle Chardon pour sa sympathie et pour m'avoir passé des commandes, à Aurélie Germain pour la préparation des derniers lots de DGT, et à Lysiane Dherret pour la communication des informations m'ayant permis d'interpréter les DGT des campagnes de terrain.

TABLE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES

Abréviations

AAS	spectrométrie d'absorption atomique couplée à une vaporisation dans un four graphite ou dans une flamme
AE	(Assimilation Efficiency) - efficacité d'assimilation par voie trophique (%)
AESN	Agence de l'Eau Seine Normandie
B[a]P	benzo[a]pyrène
BLM	Biotic Ligand Model (modèle du ligand biologique)
ChlA	Chlorophylle A
COD	Carbone Organique Dissous ($mg.L^{-1}$)
COP	Carbone Organique Particulaire ($mg.L^{-1}$)
DGT	Diffusive Gradients in Thin-films
EC50 à n jours	concentration ayant un effet pour 50% des individus lors d'un test de toxicité
E-T	écart-type
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique
FIAM	Free Ion Activity Model (modèle de l'ion libre)
HA	acides Humiques Aldrich
ICP-MS	spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif
ICP-AES	spectrométrie d'émission atomique à source plasma à couplage inductif
IR	Ingestion rate – taux d'ingestion ($g.g^{-1}.j^{-1}$)
LC50 à n jours	concentration causant la mortalité de 50% des individus lors d'un test de toxicité
MES	matières en suspension
MOD	matière organique dissoute
MRG	granules riches en métaux
NA	échantillon non analysé (donnée manquante)
ND	valeur non déterminée (sous la limite de quantification de la méthode)
pH	potentiel hydrogène, l'opposé du logarithme de la concentration en ions H^+
ps	poids sec (en indice) (g)
RUTP	rejet urbain de temps de pluie

Symboles

n=	nombre de cas, d'individus ou d'échantillons
p=	probabilité de vérification de l'hypothèse lors d'un test statistique
**	écart significatif (probabilité de l'erreur α inférieure à 5%) entre deux estimateurs statistiques
$[M]_{org}$	teneur en métal M bioaccumulé ($\mu g.g^{-1}$)
$[Cd]_{org}^{0}$	teneur en Cd initiale des gammares avant leur transplantation ($\mu g.g^{-1}$)
$[Zn]_{org}^{e}$	teneur en Zn initiale (essentielle) des gammares avant transplantation ($\mu g.g^{-1}$)
k_u	taux d'entrée par voie dissoute ($L.g^{-1}.j^{-1}$)
k_e	constante d'élimination (j^{-1})
g	constante de dilution biologique par croissance des individus (j^{-1})
k_i	taux d'entrée par voie trophique ($L.g^{-1}.j^{-1}$)
k_1	taux d'entrée par voie dissoute du modèle pour le Zn ($L.g^{-1}.j^{-1}$)
k_2	constante d'élimination du modèle pour le Zn (j^{-1})
[M]	concentration en métal M biodisponible dans l'eau ($\mu g.L^{-1}$)
$[M]_{inorg}$	concentration en métal M dans l'eau sous forme inorganique ($\mu g.L^{-1}$)
$[M]_w$	concentration en métal M dite totale (dans l'eau brute) ($\mu g.L^{-1}$)
$[M]_f$	teneur totale en métal M dans la nourriture ingérée ($\mu g.g^{-1}$)
I_f	influx d'entrée du métal par voie trophique (en $\mu g.g^{-1}.j^{-1}$)
K_i	constante d'affinité du calcium pour le transporteur du Cd ($mg.L^{-1}$)
K_m	constante d'affinité du transporteur Cd pour le Cd ($mg.L^{-1}$)
K'_m	constante apparente d'affinité du transporteur Cd pour le Cd ($mg.L^{-1}$)
V_{max}	vitesse d'internalisation maximale du Cd ($\mu g.g^{-1}.j^{-1}$)
D	coefficient de diffusion d'un métal dans la DGT ($cm^2.s^{-1}$)
A	aire de la fenêtre d'intégration de la DGT (cm^2)
Δg	épaisseur du gel de diffusion (mm)
V	volume d'élution (mL)
M	masse de métal accumulée dans la DGT (µg)

p	pente d'accumulation du métal dans la DGT en fonction du temps ($\mu g.s^{-1}$)
$[M]_{DGT}$	concentration en métal labile dans l'eau mesurée par la DGT ($\mu g.L^{-1}$)
$X^{i}_{matrice}$	mesure brute du spectromètre ICP-MS à la masse atomique i dans la matrice indiquée en indice (fèces, gammares ou feuilles) ($coups.min^{-1}$)
$[^{i}E]_{ICP-MS}$	concentration en métal E calculée par le logiciel de l'ICP-MS à partir de la mesure brute de son isotope de masse i ($\mu g.L^{-1}$)
P^{i}	abondance relative de l'isotope de masse i du métal E par rapport à l'ensemble des isotopes du même métal (sans unité)
$[T^{i}E]$	concentration élémentaire déduite du signal ICP-MS de l'isotope ^{i}E ($\mu g.L^{-1}$)
$\Delta[^{i}E]$	concentration nette de traceur isotopique du métal E de masse i ($\mu g.L^{-1}$)
$\Delta Q^{i}E_{matrice}$	quantité nette de traceur (isotope de masse i) dans la matrice indicée (ng)
$\Sigma\Delta Q^{i}E_{fèces}$	cumul des quantités nettes d'isotope ^{i}E déféquées (en phase de défécation, ng)
$\Delta Q^{i}E_{LL}$	quantité nette de traceur (isotope de masse i) ingérée (ng)

SOMMAIRE

INTRODUCTION

Les rivières sont-elles en bon état écologique ? Longtemps, la pollution en C, N, et P fut la principale source de déséquilibre du milieu aquatique en Seine (Barles, 2007). Aujourd'hui, les eaux résiduaires urbaines passent très majoritairement par une station d'épuration avant le rejet dans la rivière. Par surcroît, les impacts des déséquilibres en C, N et P dans les cours d'eau sont mieux connus et modélisés qu'auparavant, ce qui offre aux gestionnaires une maîtrise possible de ces pollutions. En revanche, la présence de dizaine de milliers de micro-contaminants soulève la question suivante : quel niveau de stress chimique laisse aux espèces vivantes du milieu aquatique la possibilité de suivre leurs dynamiques écologiques ?

Les microcontaminants sont des molécules (métaux traces, pesticides, polychlorobiphényles, résidus de matières plastiques, substances pharmaceutiques etc.) présentes à de faibles concentrations dans un milieu donné (de l'ordre du microgramme au milligramme par litre ou par kilogramme) et qui peuvent avoir un impact notable sur les usages et les écosystèmes[1]. La contamination du milieu aquatique en ces substances reste méconnue, tant du point de vue du devenir dans l'environnement, de l'exposition des organismes aquatiques, que des effets toxiques aux différents niveaux de l'écosystème : individu, population, chaîne trophique, écosystème. C'est pourquoi la compréhension de leur impact sur le milieu représente l'enjeu principal en vue de l'amélioration de l'état écologique des rivière et de la qualité de l'eau vis-à-vis de la santé humaine (Chapman, 1992; Garric et al., 2001).

Selon la définition figurant à l'article 2 de la directive européenne (2000), des eaux de surface (continentales) en bon état doivent à la fois permettre un bon fonctionnement des écosystèmes aquatiques et satisfaire à des normes de qualité environnementale physico-chimiques. Ce contexte technique et législatif rend nécessaire une compréhension approfondie des interactions entre les conditions chimiques et le fonctionnement biologique des cours d'eau. Pour parvenir à cela, il est légitime de focaliser les recherches à l'échelle

---

[1] Définition tirée du glossaire national des schémas d'aménagement et de gestion des eaux, disponible à l'adresse : http://ruisseau.oieau.fr/eaudoc/integral/sdage.htm

biologique de l'organisme, car premièrement cela permet d'en déduire des effets à l'échelle des populations, deuxièmement c'est une échelle essentielle des processus liés au stress causé par les microcontaminants, et enfin car cela ouvre sur des possibilités techniques de biosurveillance du milieu (Maltby, 1999).

A l'échelle de l'individu, les microcontaminants peuvent être bioaccumulés, phénomène que l'on distingue des effets toxiques qu'ils peuvent causer. Ces derniers nécessitent, en effet, que les substances rencontrent une cible biologique, support de la toxicité. La bioaccumulation désigne l'entrée nette d'une substance chimique (usuellement une substance non-essentielle) par une ou toutes les voies possibles (i.e. respiratoire, trophique, dermique etc.) et à partir de tous compartiments de l'environnement (eau, phase dissoute, sédiment, autre organisme etc.) (Rand, 1995). Et, en lien avec cette notion, la biodisponibilité d'un contaminant est définie comme la proportion du contaminant présent dans l'environnement sous une ou plusieurs formes assimilables par un organisme (Pelletier et al., 2004). Il est particulièrement pertinent de s'attacher à mettre en évidence les liens entre la bioaccumulation et la présence des microcontaminants dans différents compartiments du milieu aquatique car :

- La mesure de la bioaccumulation est spécifique d'une substance donnée, ce qui ouvre sur des possibilités de suivis spécifiques d'une substance ou d'un groupe de substances d'une part, et d'autre part permet de mettre en évidence des processus d'interaction avec le biote des substances elles-mêmes,

- la bioaccumulation constitue la genèse de la toxicité dans le cas des métaux traces, avec lesquels les effets toxiques peuvent être vus comme une conséquence d'une bioaccumulation,

- la notion de biodisponibilité, qui reste pourtant scientifiquement délicate, est d’ores et déjà invoquée dans les dossiers d’évaluation du risque (cf. Zinc),

- l’ordre de priorité de la classification des microcontaminants en substances dangereuses est déterminé à partir de critères PBT (substances Persistantes, susceptibles de Bioaccumulation et Toxiques), parmi d'autres critères (Jones et de Voogt, 1999).

La teneur bioaccumulée par un organisme aquatique dépend, non-seulement de la contamination de l’eau et de la nourriture, mais aussi de facteurs de contrôles biologiques et physico-chimiques. En effet, au niveau de l’organisme, la bioaccumulation est contrôlée par des processus d’échange de substances (accumulation/excrétion), dont les caractéristiques sont propres à chaque espèce. De plus, la biodisponibilité des contaminants dans les matrices environnementales (eau, sédiment, algues, biofilm, proies, débris végétaux, etc.) dépend de facteurs de contrôles physico-chimiques comme la dureté de l’eau (Wright, 1980), l’état d’oxydation d’un sédiment, la localisation intracellulaire des métaux dans les algues, etc. Une étude de la bioaccumulation, dans la mesure où elle vise à s’appliquer à des situations de terrain pour lesquelles ces facteurs peuvent varier, ne peut s’affranchir de mettre en évidence et d’analyser les influences de ces facteurs de contrôle.

L’étude des facteurs de contrôle de la bioaccumulation des métaux traces est facilitée en sélectionnant une espèce parmi celles qui séquestrent les métaux dans certaines parties de leur corps en vue de leur détoxication (Phillips et Rainbow, 1989). Ont été proposées par exemple certaines espèces d'insectes (Buchwalter et Luoma, 2005), et certaines espèces de crustacés aquatiques incluant l'amphipode *Gammarus pulex* (Xu et Pascoe, 1993), le mysidacé *Mysis relicta* (Lasenby et Duyn, 1992), et le bivalve *Dreissena polymorpha* (Voets et al., 2004). En France, les espèces *Gammarus pulex* et *Gammarus fossarum*, que nous associons sous le vocable de *G. pulex* (les deux espèces étant difficilement distinguables), sont présentes dans la plupart des cours d'eau et occupent une position clef des réseaux trophiques en tant que proie de nombreux poissons (MacNeil et al., 1997). De plus, la connaissance de ces deux espèces bénéficie de nombreuses études hydrobiologiques et écotoxicologiques décrivant, par exemple, les conditions de leur présence dans les milieux (Peeters et Gardeniers, 1998), leur comportement nutritif complexe (Graca et al., 1993a; Graca et al., 1993b; Graca et al., 2001), leurs réponses physiologiques et comportementales à la contamination en métaux (Felten et al., 2008), leur résistance au stress chimique et leur caractère polluo-tolérant (Rainbow et Moore, 1986; Stuhlbacher et Maltby, 1992) etc. Enfin, le développement de suivis de la contamination des milieux aquatiques en métaux (et en d'autres microcontaminants) fondé sur l’étude de la bioaccumulation ou de diverses réponses biologiques de l’espèce *G. pulex* a d'ores et déjà été initié, que ce soit par des techniques de transplantation d’organismes mis en cages (Shutes et al., 1991) ou par

l'analyse de la contamination des individus sur site (Fialkowski et al., 2003). L'ensemble de ces critères nous a conduis à sélectionner cette espèce pour étudier les facteurs de contrôle de la bioaccumulation des métaux traces.

Le Cd présente un caractère toxique important alors même qu'il reste présent de façon résiduelle dans l'environnement aquatique, raisons qui font qu'il est classé comme substance dangereuse prioritaire dans la directive cadre européenne sur l'eau. Il s'agit d'un métal bioaccumulable pour lequel on ne peut généralement pas négliger la voie trophique de bioaccumulation chez les invertébrés (Luoma et Rainbow, 2005). Il est non-essentiel et la teneur basale des individus en site non-contaminé peut être très basse, ce qui facilite l'étude de la bioaccumulation aux faibles niveaux d'exposition. Enfin, il implique des mécanismes de détoxication chez *G. pulex* encore peu connus et des études complémentaires s'attachent à caractériser sa toxicité chronique aux niveaux comportemental et biochimique, menées notamment au Cemagref de Lyon (Geffard et al., 2007; Felten et al., 2008). Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons sélectionné le Cd pour cette étude. Par ailleurs nous avons tenté d'élargir notre étude au cas des microcontaminants organiques en utilisant le B[a]P.

L'objectif général de cette thèse est de relier la contamination chimique du milieu aquatique en Cd et en B[a]P à la contamination *in situ* chez *G. pulex*, en prenant en compte :

- les facteurs biologiques de contrôle intrinsèques aux organismes (voies d'exposition, cinétiques d'accumulation et de dépuration),
- les facteurs biogéochimiques de contrôle de la contamination chimique biodisponible *in situ*.

L'interprétation des données *in situ* de bioaccumulation en lien avec la contamination chimique du milieu sera approfondie dans le cadre d'une approche de type biodynamique (Luoma and Rainbow 2005). L'évaluation des contaminants biodisponibles s'appuiera sur les techniques d'échantillonnage passif, DGT –Diffusive Gradients in Thin-films, gradients de diffusion en couches minces- pour les métaux et SPMD -Semipermeable Membrane Device- pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ces techniques renseignent sur la spéciation des contaminants en phase dissoute et donc sur les apports par voie dissoute. Les

apports possibles par voie trophique et par la phase particulaire seront également étudiés.

Ce manuscrit comprend quatre parties. La première synthétise les connaissances actuelles sur la biodisponibilité des métaux traces (centrée sur celle du Cd) pour les invertébrés aquatiques en illustrant par des exemples pris dans le bassin versant Seine-Normandie. La seconde partie présente les études quantifiant les apports de bioaccumulation du Cd et de B[a]P par voie dissoute en fonction, pour le Cd, des conditions modifiant sa biodisponibilité. Les deux premiers chapitres de cette partie ont fait l'objet d'un article publié et reproduit en annexe 3. La troisième partie est consacrée à l'étude de la voie trophique de bioaccumulation du Cd et du Cu chez *G. pulex*. Elle fait l'objet d'un article en préparation. Enfin, la quatrième partie traite de l'interprétation des contaminations observées *in situ* en métaux traces chez *G. pulex*, soit par la technique de transplantation d'organismes en cages, soit de gammares autochtones.

I. ETAT DES CONNAISSANCES SUR LA BIODISPONIBILITE DES METAUX TRACES POUR LES INVERTEBRES AQUATIQUES

La biodisponibilité des métaux traces du milieu aquatique est un sujet qui met en jeu de façon intriquée des notions de chimie de l'environnement et de biologie. Les références suivantes décrivent la biodisponibilité en ne séparant pas la dimenison chimique de la dimension biologique de ce concept : les articles de revue de Simkiss et Taylor (2001) et de Slaveykova et Wilkinson (2005) concernant la biodisponibilité par voie dissoute, et l'ouvrage de Meyer et al. (2005) sur la voie trophique. Dans un souci de clarté, nous traitons dans un premier chapitre des questions liées à la présence des métaux dans l'environnement (en illustrant préférentiellement par des exemples sur le Cd se trouvant dans le bassin Seine-Normandie), et dans un deuxième chapitre de la bioaccumulation en tant que processus biologique, en détaillant celle des métaux chez le gammare. Enfin, le troisième chapitre synthétise les développements actuels des techniques de biosurveillance par mesure chimique dans les crustacés d'eau douce.

I.1 LES METAUX DANS LES RIVIERES

I.1.1 Importance et propriétés des métaux dans le milieu aquatique

I.1.1.1 Sources naturelles et anthropiques de métaux

Trois phénomènes concourent à enrichir les eaux de surface en métaux traces :

- les précipitations atmosphériques,
- l'altération chimique (dissolution et lessivage) et mécanique (érosion) des sols et du sous-sol du bassin versant,
- les rejets industriels, agricoles et d'eaux usées urbaines (épurées ou non).

Les métaux apportés par ces sources peuvent être d'origine naturelle, par exemple les aérosols volcaniques, ou l'érosion des aluminosilicates, particules riches en métaux. Néanmoins, une part importante, sinon prépondérante, des métaux du milieu aquatique

provient de rejets consécutifs à diverses activités humaines (Thévenot et al., 1998). L'étude de Lestel et al. (2007), par exemple, inventorie les contributions de différentes activités humaines (usages domestique, industriel, agricole) sur les flux de Zn dans le bassin versant de la Seine. Notons que seule une partie du flux de Zn mesuré au barrage de Poses (Eure) est expliquée par l'inventaire des rejets anthropiques connus. Sans présager de leurs importances respectives, nous illustrons certains apports anthropiques de cadmium dans les rivières urbaines du bassin versant de la Seine par la Figure 1. Ces apports comprennent : le lessivage des métaux des sols agricoles (le Cd est présent à l'état de traces dans certains engrais phosphatés), les rejets urbains (par exemple par corrosion métallique des toits de la région parisienne), les rejets industriels de métaux via l'atmosphère ou une station d'épuration et enfin, les fuites de métaux dans l'eau souterraine au niveau des anciennes décharges (Thévenot et al., 1998; Gromaire-Mertz, 2000).

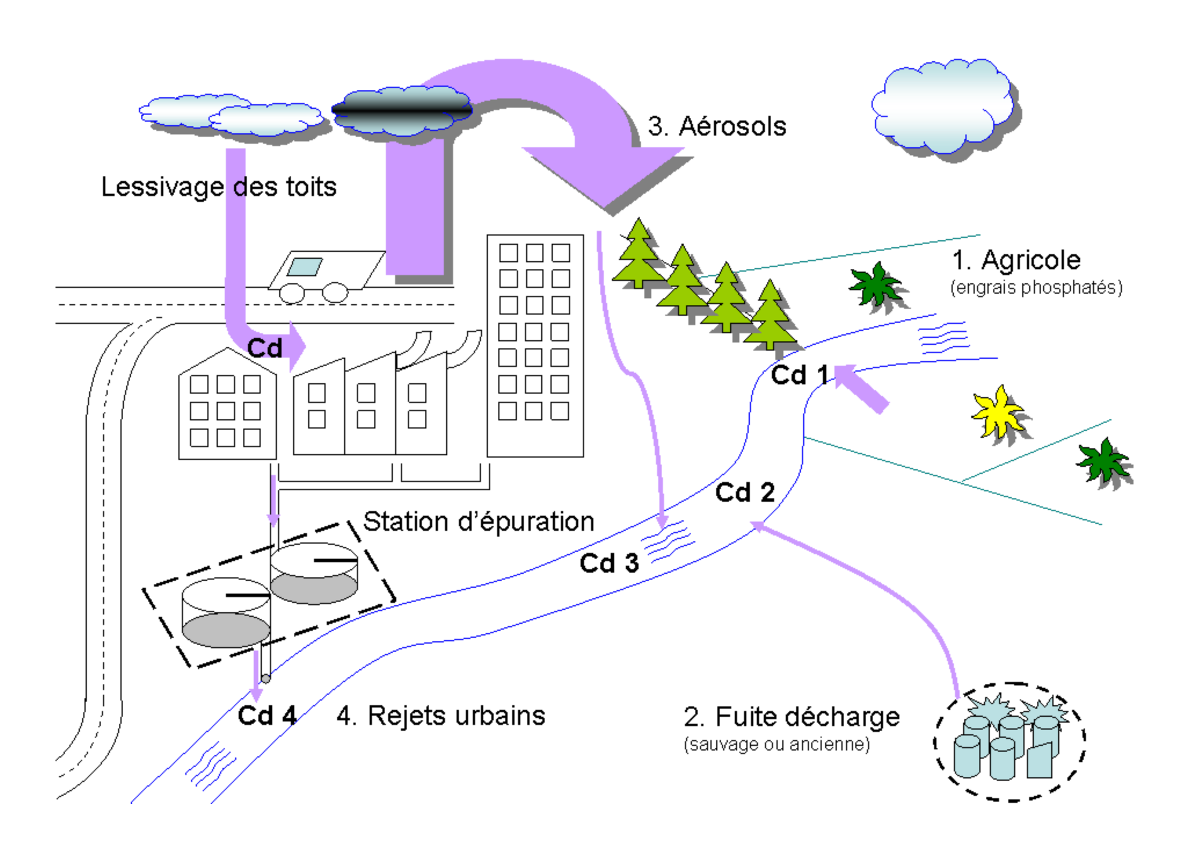


Figure 1 Sources de contamination en Cd des cours d'eau urbains et périurbains. Quatre apports à la rivière sont schématisés.

I.1.1.2 Contamination en métaux, passée et présente, par les activités humaines

La Seine a été l'un des fleuves les plus contaminés en métaux traces au niveau mondial, en

dépit d'une activité minière faible au sein de son bassin versant, activité fortement génératrice de pollutions métalliques dans d'autres contextes. Par exemple en Cd, un facteur d'enrichissement des matières en suspension (MES) par rapport au bruit de fond naturel supérieur à cent a été atteint dans les décennies 1960-70 et 70-80 (Meybeck et al., 2007). De plus, les chroniques de contamination relevées par analyse des carottes sédimentaires montrent que les teneurs en Cd et en Zn des sédiments ont diminué respectivement d'un facteur dix et deux entre 1985 et 2005. On retrouve de telles diminutions dans la colonne d'eau par des diminutions des teneurs en Cd et en Zn des MES, respectivement d'un facteur sept et deux entre 1983 et 2003 (Meybeck et al., 2007). Depuis les années 70, la région parisienne a connu une désindustrialisation. Ces diminutions sont aussi imputables à l'action des pouvoirs publics depuis vingt ans.

A l'heure actuelle, la contamination des rivières du bassin versant de la Seine reste supérieure au bruit de fond naturel en Cd, Cu et Zn. Les concentrations en Cu, Cd et Pb dissous varient indépendamment du débit dans la Seine et dans la Marne (Elbaz-Poulichet et al., 2006) et avaient, à la station la Seine à Poissy, pour valeur moyenne respectivement 2 $\mu g.L^{-1}$, 0,031 et 0,35 entre février 2003 et décembre 2004. La concentration en Zn dissoute mesurée en juin 2004 dans la Seine à Chatou par Tusseau-Vuillemin et al. (2004a) était de 6 $\mu g.L^{-1}$. Le milieu aquatique, bien que moins contaminé qu'auparavant, subit les apports de la conurbation parisienne puisqu'il existe un gradient amont-aval de contamination. Les teneurs métalliques des MES à différentes stations le long de la Seine révèlent de tels gradients en Cd, Zn, Cu et Pb, mais pas en Ni (2004a). De plus, Tusseau-Vuillemin et al. (2007) ont observé un léger gradient de contamination en concentration en Cd dissous. Elle augmente de 0,023 à 0,037 $\mu g.L^{-1}$ entre les stations de Saint-Maurice (Marne, en amont de Paris) et celle d'Andrésy (Seine, à l'aval de Paris).

Remarque

Les concentrations en Cd dissous dans les eaux rejetées par la station d'épuration Seine aval, qui draine une grande partie des rejets urbains parisiens, ont été détectées sous la limite de quantification de 0,02 $\mu g.L^{-1}$ lors de l'étude de Buzier et al. (2006a).

Les orientations légales de protection de la qualité de l'eau sont établies par la directive cadre 2000/60/CE du 22/12/2000, qui vise les eaux continentales, souterraines et côtières. Et la directive 2008/105/CE (2008) définit les normes de qualité environnementales (NQE) des eaux. Les NQE des métaux, c'est-à-dire Cd (cf. Tableau 1), Pb, Hg et Ni, sont définies pour la fraction dissoute de l'eau filtrée à 0,45 µm.

Dureté calcique de l'eau, en $mg.L^{-1}$ de $CaCO_3$	NQE du Cd en $\mu g.L^{-1}$ (dissous)
inférieure 40	0,08
de 40 à 50	0,08
de 50 à 100	0,09
de 100 à 200	0,15
supérieure à 200	0,25

Tableau 1 Normes de qualité environnementale pour le Cd des masses d'eau dans l'Union européenne, telles que définie par la directive 2008/105/CE (2008)

I.1.2 La spéciation des métaux

Par spéciation chimique d'un métal on entend sa répartition entre différentes formes physiques ou chimiques (Templeton et al., 2000). On distingue les formes physiques d'un métal appelées métal particulaire et métal dissous en solution par filtration à 0,45 µm. D'un point de vue chimique, la spéciation du Cd dans une eau brute de rivière (en Ile de France par exemple) comprend les espèces suivantes : Cd^{2+}, le cation libre c'est-à-dire solvaté par des molécules d'eau, $CdOH^+$, $CdCl^+$, $CdCl_2$, $Cd(SO_3)_2^{2-}$, $CdSO_3$, $CdHCO_3^+$, $Cd(CO_3)_2$, différentes formes de Cd liées à la matière organique dissoute, à la matière organique particulaire, aux particules minérales en suspension etc.

On appelle ligand une molécule liée à un atome central, ici métallique, dans une entité moléculaire polyatomique qu'on nomme complexe métallique. Les ligands inorganiques (Cl^-, CO_3^{2-}, S^{2-} et HS^-, SO_4^{2-}, et dans une moindre mesure F^-) forment avec les métaux des

complexes dont les constantes de stabilité dépendent de différents facteurs dont la concentration en métal, celle en ligand, la température, la force ionique et le pH (Stumm et Morgan, 1996).

Deux raisons principales expliquent l'importance de la notion de spéciation chimique. D'une part le transport des métaux dans l'environnement dépend des espèces physiques qu'ils forment dans le milieu, d'autre part leur réactivité chimique et biologique en dépend aussi, et *a fortiori* leur toxicité, vis-à-vis du vivant. C'est dans cette seconde optique que nous détaillons les aspects de la spéciation des métaux.

En milieu urbain, la matière particulaire peut contenir une part importante des métaux totaux de l'eau (au moins pour Fe, Cu, et Zn). Et à l’instar des métaux dissous, il existe une spéciation chimique des métaux associés aux particules, certains étant plus facilement extractibles par désorption ou par attaque acide. En fonction de cette spéciation, ces métaux sont plus ou moins facilement échangeables avec les métaux en phase dissoute : le Fe des particules d'oxydes de Fe ne l'est pas alors que le Cd complexé par une particule d'argile pourra l'être (Tessier et al., 1979).

I.1.2.1 La matière organique dissoute des cours d'eau

La matière organique dissoute (MOD) est séparée de la matière particulaire par filtration de l'eau brute (généralement à 0,45 µm). On mesure la concentration en carbone organique dissous (COD) en mesurant la concentration en carbone totale de l'échantillon d'eau filtrée et la concentration en carbone organique particulaire en déterminant le contenu en carbone du filtre.

L'eau de rivière contient généralement entre 0,5 mg et 10 mg par litre de COD (Haitzer et al., 2001). Entre l'amont et l'aval de l'agglomération parisienne, le COD passe de 2 à 4 $mgC.L^{-1}$ et son caractère hydrophobe tend à diminuer ce qui montre qu'un mélange de MOD de différentes origines à lieu (Pernet-Coudrier, 2008). La MOD des cours d'eau franciliens provient ponctuellement de rejets anthropiques dans la rivière, auxquels s'ajoutent une partie provenant du lessivage naturel des sols du bassin versant et de la dégradation des plantes aquatiques. La quantité et l'origine de la MOD influencent ses propriétés de

complexation vis-à-vis des métaux.

La complexation des métaux par la MOD repose majoritairement sur l'action chimique des substances humiques (Buffle et al., 1990; Buffle et Filella, 1995). La MOD est constituée de molécules et de microparticules organiques et, entre un tiers et la moitié de ces composés constitue une classe de substances appelée substances humiques (SH). Cette classe comprend les molécules issues du processus de dégradation de la matière organique, sous l'action microbienne, lors du processus d'humification. A l'échelle moléculaire, les SH présentent de nombreux groupes carboxyliques et phénoliques, qui sont autant de sites de complexation dominant la réactivité des métaux dissous. Les SH présentent également des sites d'autres types fonctionnels de forte affinité pour les métaux (sites amino, quinone et sulfhydrile).

En laboratoire, on utilise couramment des complexants organiques modèles comme l'EDTA ou l'acide benzoïque (cf. Figure 2) ainsi que des sels de sodium d'acides humiques commerciaux, pour étudier l'influence d'une matière organique sur la labilité et la biodisponibilité des métaux. Ces macromolécules sont séparées de l'ensemble très hétérogène de molécules et de particules organiques qui compose la MOD par des techniques de fractionnement chimique. De façon classique, on distingue trois sous-ensembles: les humines, substances insolubles à tous pH, les acides fulviques, substances solubles à tout pH et les acides humiques, substances solubles uniquement à pH acide (Thurman et Malcolm, 1981).

Figure 2 Trois molécules organiques qui complexent les métaux. 1. Structure du complexe de l'EDTA avec un métal. 2. Formule développée de l'acide benzoïque. 3. Modèle de structure des acides humiques proposé par Stevenson (1982).

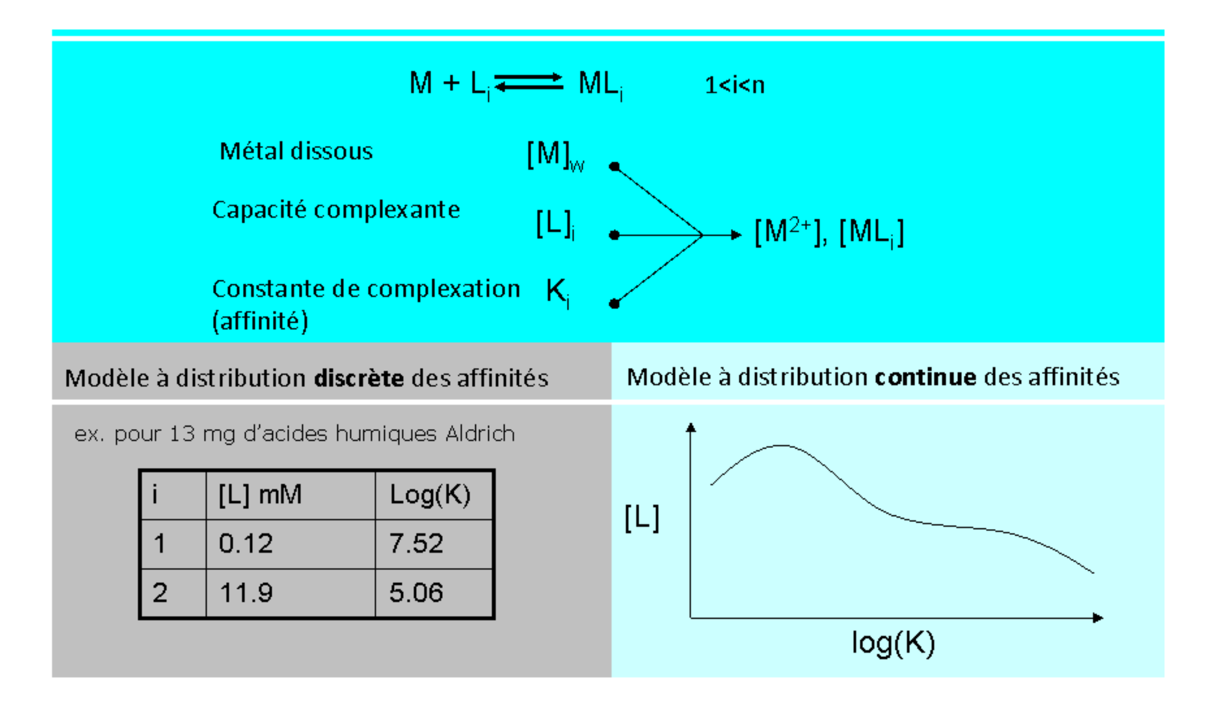
Pour autant, il faut noter que cette classification, fondée sur un fractionnement par des techniques de solubilisation couplées à des techniques de sorption en colonne de résine ionique, est un parti pris analytique possible parmi d'autres. Il ne correspond pas directement à une séparation sur un critère chimique de réactivité avec les métaux traces (Filella et al., 2001). Ceci est confirmé expérimentalement par la relative similarité des constantes de complexation pour le cuivre des différentes fractions de MOD obtenues par Pernet-Coudrier (2008).

En résumé, on retrouve un grand nombre de ligands potentiels des métaux, organiques et inorganiques dans la fraction dissoute de l'eau des rivières. La nature hétérogène de la MOD, y compris de ses substances humiques, fait qu'il est difficile de déterminer la spéciation des métaux en présence de MOD. La caractérisation des propriétés de complexation de sous-fractions des SH permet de faire les premiers pas vers l'étude du comportement des métaux en milieu contenant des complexants organiques.

I.1.2.2 Equilibres chimiques de complexation des métaux en solution

En milieu aquatique minéral (sans MOD), les concentrations des différentes formes chimiques d'un métal, à l'équilibre en solution, peuvent être calculées à partir de la composition minérale de l'eau et des constantes thermodynamiques de complexation du métal avec les ligands inorganiques en présence. Lorsque l'eau contient des matières organiques dissoutes, une partie du stock de métaux dissous s'associe à celles-ci par complexation, et par d'autres formes d'interaction (par exemple de nature électrostatique). L'association métaux-MOD peut être modélisé à l'équilibre chimique en solution selon le formalisme de la complexation (Town et Filella, 2000a), ou bien selon un formalisme qui décrit le phénomène de complexation et une composante d'interaction électrostatique, cf. le modèle NICCA-Donnan de Benedetti et al. (1996).

Suivant le formalisme des équilibres de complexation, on ne considère qu'un nombre fini (généralement égal à 2 ou 3) de type de ligands organiques des métaux au sein de la MOD. L'ion métallique libre, de concentration [M], est considéré complexé par un nombre *n* de types de ligands organiques de concentrations $[L_i]$ (i compris entre 1 et *n* avec *n*=2 ou 3) donnant les formes complexées du métal, de concentrations $[ML_i]$ cf. Figure 3. Les propriétés thermodynamiques des ligands organiques sont donc discrétisées. En revanche, le formalisme du modèle NICCA-Donnan repose sur une approche continue du nombre de sites de fixation des cations et de leurs constantes de complexation, liée au formalisme de l'adsorption des métaux sur des surfaces utilisant les isothermes de Langmuir-Freundlich (Benedetti et al., 1996). Ce modèle suppose qu'il existe autant de site de complexation des métaux que ceux du proton H^+. Et ce modèle continu permet de mieux tenir compte du caractère hétérogène et complexe de la matière organique dissoute qu'un modèle avec deux ou trois couples de concentrations de ligands couplées à des affinités, cf. Figure 3.



i	[L] mM	Log(K)
1	0.12	7.52
2	11.9	5.06

Figure 3 Présentation synthétique de deux formalismes possibles de la complexation des métaux par les matières organiques dissoutes. M symbolise un métal, L_i le i-ième ligand, ML_i le complexe métallique formé et K_i la constante de complexation. En bas à gauche : couples (L, K) de la distribution discrète de Van Ginneken et al. (2001).

En pratique, on modélise la spéciation d'un métal à l'équilibre thermodynamique dans une eau dont on connaît les caractéristiques chimiques (ions majeurs, pH et T principalement), à l'aide de logiciel de spéciation comme VisualMINTEQ[2]. Ce logiciel utilise les constantes de stabilité des équilibres chimiques connues pour les ligands inorganiques et certains ligands organiques (par ex. l'EDTA, la glycine, le glucose etc.), et utilise des modules complémentaires pour prendre en compte la spéciation par les matières organiques dissoutes – des modèles de réactivité chimique, notamment concernant les substances humiques. VisualMINTEQ permet ainsi de calculer la spéciation des métaux en présence de ligands organiques suivant un formalisme discret (à partir des constantes de complexation connues) ou bien suivant le modèle NICCA-Donnan (à partir de distributions d'affinité intégrées au logiciel pour certains type de MOD). Après avoir défini la spéciation des métaux et examiné le formalisme de leur complexation par les MOD, nous présentons la méthode de mesure de la spéciation choisie dans le cadre de cette thèse et quelles informations cette technique apporte en matière de spéciation.

---

[2] Disponible à l'adresse internet : http://www.lwr.kth.se/English/OurSoftware/vminteq/

I.1.2.3 Echantillonnage passif des métaux par la technique de la DGT

Principe

Une mesure possible des métaux labiles en solution s'opère par échantillonnage passif, par la technique DGT (gradients de diffusion en couche mince, en anglais Diffusive Gradients in Thin-films) inventée par Davison et Zhang (1994). Le principe est de contraindre l'accès des métaux de la fraction dissoute à une résine Chelex fortement complexante par un gel de diffusion de caractéristiques définies. Les espèces métalliques associées à la phase particulaire de l'eau ne sont pas échantillonnées car un filtre est placé entre le gel et le milieu (cf. Figure 4).

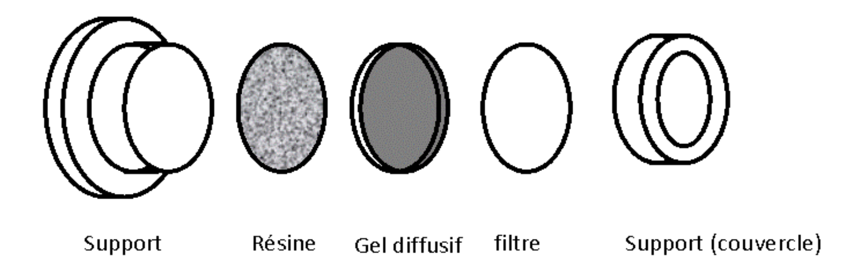


Figure 4 Schéma de la DGT, adapté de Gimpel et al. (2003). Les supports sont en plastique et le filtre en nitrocellulose (seuil de coupure 0,45 µm dans cette étude).

Ce dispositif permet de lier quantitativement la quantité de métal accumulée sur la résine à la concentration en métal labile en solution, selon l'Équation 1 proposée par Davison et Zhang (1994) et qui est une réécriture de la première loi de Fick de la diffusion dans le gel :

Équation 1

$$M = \frac{D.[M]_{DGT}.t.A}{\Delta g}$$

où *M* est la masse de métal accumulée par la résine (µg) après une durée *t* (s), D le coefficient de diffusion du métal dans le gel ($cm^2.s^{-1}$), $[M]_{DGT}$ la concentration en métal labile dans la solution ($µg.L^{-1}$), *A* la surface du gel exposée (cm^2), et Δg l'épaisseur du gel (cm).

On utilise souvent une réécriture de l'Équation 1 pour déterminer directement $[M]_{DGT}$ selon l'Équation 2 :

Équation 2

$$[M]_{DGT} = \frac{M.\Delta g}{D.t.A}$$

M est déterminée, après récupération de la résine Chelex et élution de ses métaux dans une solution acide, par une technique analytique de mesure des concentrations métalliques (AAS, ICP-MS ou ICP-AES dans cette thèse). Le coefficient de diffusion dans un gel d'un complexe métallique (y compris l'ion libre solvaté) dépend de la nature du gel utilisé et de la température. Il est proche de celui du complexe métallique dans l'eau puisque le gel en est composé à environ 80%, mais inférieur, car un chemin tortueux est imposé à la diffusion des espèces métalliques dans le réseau polymérique du gel. Aussi, plus le gel est dense, plus le coefficient de diffusion D est inférieur à celui de l'eau. Pour un gel de 15% d'acrylamide avec 0.3% d'agarose[3] (gels dits non restrictifs, NR), les coefficients D des principaux cations métalliques libres ont été tabulés à différentes températures entre un et trente-cinq degrés (°C) par Zhang[4], et une loi permet de calculer D pour un métal en fonction de la température. Pour un gel en polymère de bis-acrylamide réticulé par ajout de monomère d'acrylamide (appelé gel restrictif R), les coefficients D sont déduits de ceux des gels (NR) en appliquant un facteur 0,83, identique pour tous les cations métalliques.

Contrôle de la diffusion des espèces métalliques et mesure de spéciation

Le formalisme exposé ci-dessus est construit sur un calcul de diffusion du cation métallique libre dans le gel. Or les complexes inorganiques et organiques des métaux dans la phase dissoute diffusent aussi dans le gel. Ces complexes ne réagissent pas avec la résine de Chelex, ceci a été prouvé expérimentalement sur l'exemple du complexe du cuivre avec l'acide nitriloacetique (Scally et al., 2003). En revanche, les complexes ayant le temps de se dissocier et de libérer le cation métallique durant leur migration à travers le gel vont contribuer à augmenter la concentration en métal labile. Un modèle numérique a été développé pour rendre compte de manière quantitative de la labilité des complexes métalliques en fonction de leur caractéristiques cinétiques de dissociation et des coefficients

[3] composé réticulant le gel polymère, cross-linker

[4] La table des valeurs est disponible à l'adresse internet http://www.dgtresearch.com/dgtresearch/dgtresearch.pdf

de diffusion des cations et des complexes métalliques (Tusseau-Vuillemin et al., 2003). On peut distinguer les complexes métalliques entièrement labiles (ceux dont le gradient de concentration dans le gel fait que la concentration en complexe métallique s'annule sur une distance plus courte que l'épaisseur du gel), partiellement labiles et non-labiles.

Ainsi, la nature et l'épaisseur du gel sont les deux variables de contrôle de la diffusion des espèces métalliques dans la DGT. En faisant varier leurs caractéristiques, on échantillonne donc différentes concentrations en métaux labiles en solution. C'est pourquoi il est nécessaire de conserver une définition opérationnelle de la labilité. Par exemple les gels R, qui sont plus denses que les NR, ont été inventés dans le but de limiter l'échantillonnage de complexes organiques labiles : ils bloquent la diffusion de complexes de grande taille moléculaire comme ceux des métaux avec des substances humiques (Davidson et Zhang 1999). Par exemple, l'utilisation de gels R en complément de gel NR permet de distinguer (en les mesurant) les concentrations en complexes métalliques labiles *inorganiques* et en complexes métalliques labiles *organiques* quand les métaux sont complexés par des acides humiques et fulviques (Zhang et Davison, 2000).

Remarque

Outre le gel de diffusion, il existe en réalité deux couches de diffusion supplémentaires dans la DGT: le filtre devant le gel et la couche limite de diffusion dans l'eau (CL). Il n'est pas nécessaire de prendre en compte une constante D spécifique pour le filtre, du fait de sa faible épaisseur (0,13 mm) devant celle du gel (entre 0,7 et 1,2 mm) : un changement de 20% sur la valeur de D dans le filtre entraîne moins de 3% de variation de la concentration labile calculée (Gimpel et al., 2003). Par contre, la CL n'est pas toujours aussi fine qu'on pourrait le supposer initialement. Elle est approximativement la même pour tous les métaux et d'environ 0,23 mm lorsque les DGT sont placées à proximité d'un agitateur rotatif (Warnken et al., 2006). Dans le cas de solutions non-agitées, cette CL peut ne pas être de faible épaisseur devant celle du gel et il est donc nécessaire de mesurer cette couche de diffusion à chaque expérience en milieu peu agité. En pratique, on peut s'affranchir d'une telle détermination en calibrant la mesure du métal labile en milieu minéral (peu agité et dans les conditions de l'expérience), et en supposant que la concentration en métal labile est égale à celle en métal dissous.

I.1.2.4 Conclusions

En conclusion, la spéciation des métaux dissous est contrôlée par les espèces chimiques minérales et organiques, en particulier la MOD. Le formalisme classique des équilibres chimiques de complexation en solution peut s'appliquer à certains modèles de MOD ou certaines fractions de la MOD caractérisées chimiquement. Néanmoins, dans le milieu naturel, la spéciation des métaux échappe à cette description formalisée sur un plan physico-chimique, du fait de la caractérisation partielle des propriétés de la MOD. On peut estimer les concentrations des différentes espèces en solution grâce aux données fournies par une ou plusieurs méthodes de séparation (on commence par mesurer le métal total, puis le métal dissous, puis le métal dissous de la phase "minérale" etc.). Enfin, la technique DGT permet de mesurer une concentration en métal labile en solution, qui représente une mesure de la spéciation. Cependant, l’interprétation sur un plan chimique de cette mesure n’est possible qu’en conditions contrôlées, en utilisant des complexants chimiques dont les

propriétés thermodynamiques et cinétiques de complexation des métaux sont connues.

I.1.3 Toxicité et biodisponibilité des métaux

A l'échelle individuelle, il est admis que le phénomène de toxicité se déroule suivant trois phases : la phase d'exposition, la phase toxicocinétique et la phase toxicodynamique.

- Concernant l'exposition, il a été montré qu'on ne pouvait pas prévoir la toxicité ou la bioaccumulation d'un métal dans le cas général sur la base de sa concentration totale dans le milieu dissous (Campbell, 1995). De plus, la localisation des métaux dans la nourriture peut influencer la proportion du métal total de celle-ci assimilable par les organismes aquatiques (Meyer et al., 2005),
- la phase toxicocinétique comprend la bioaccumulation, la distribution interne, le métabolisme et l'élimination de la substance toxique par l'organisme,
- la phase toxicodynamique désigne les mécanismes biologiques résultant du mode d'action des substances toxiques ayant accédé à un site d'action dans l'organisme.

La bioaccumulation n'est donc pas un effet toxique en soi mais un précurseur des effets toxiques. On présentera dans ce chapitre d'abord une synthèse de la toxicité du Cd pour les gammares puis la notion de biodisponibilité par chacune des voies de contamination des organismes aquatiques, en détaillant le lien entre biodisponibilité et spéciation du Cd par la voie dissoute.

I.1.3.1 Effets toxiques des métaux chez les invertébrés aquatiques

La toxicité à l'échelle des organismes aquatiques peut s'exprimer en termes de concentration létale pour 50% des individus lors d'un test de létalité d'une substance (LC50), en précisant la durée du test, et dans la mesure où elles comptent, les conditions biologiques et chimiques de l'expérience. On qualifie un test de toxicité d'aiguë, de sub-chronique et de chronique selon la durée de l'exposition par rapport à la durée de vie des organismes (Rand et al., 1995). Le gammare ayant une durée de vie d'environ quatre cent jours, on prendra conventionnellement les limites de durée de quatre jours entre des tests de toxicité dite aiguë et sub-chronique et de sept entre celles dites sub-chronique et

chronique. Les LC50 du Cd à quatre et sept jours chez *Gammarus pulex* mâle adulte sont de 82 µg.L^{-1} et 21 µg.L^{-1} (McCahon et Pascoe, 1988b; Felten et al., 2008). Ceci délimite les domaines des toxicités aiguë, sub-chronique et chronique du Cd chez *G. pulex*.

Lors de tests de toxicité aiguë, la composition de l'eau influence la sensibilité des gammares d'eau douce au Cd :

- plus le pH baisse, plus *G. fossarum* est sensible au Cd (Musko et al., 1990),
- des concentrations croissantes en ions calcium, de 115 à 180 mg.L^{-1}, font diminuer la toxicité du Cd pour les gammares en phase de recalcification (McCahon et Pascoe, 1988a).

De plus, l'état biologique des gammares influence la toxicité aiguë du Cd pour *G. pulex* :

- les gammares recalcifiant leur exosquelette (durant les sept jours suivant la mue) sont plus sensibles au Cd que ceux en inter-mue, la LC50(Cd) à deux jours passant de 44 µg.L^{-1} en à 138 µg.L^{-1} (McCahon et Pascoe, 1988a).
- durant le cycle de reproduction, les gammares femelles portant des œufs non-fécondés sont plus sensibles au Cd que les femelles portant des œufs en développement, elles-mêmes plus sensibles que les mâles, les LC50 à deux jours étant respectivement de 21, 140 et 210 µg.L^{-1} (McCahon et Pascoe, 1988b).
- les LC50 à quatre jours du Cd chez l'amphipode estuarien *Leptocheirus plumulosus* juvénile et adulte sont respectivement de 360 µg.L^{-1} et de 880 µg.L^{-1} (McGee et al., 1998).

En matière de toxicité chronique et sub-chronique, les travaux de Kendall et al. (1985) indiquent que *G. pulex* est le macro-invertébré d'eau douce le plus sensible au Cd parmi les dix testés (plus sensible que *Asellus aquaticus* et que *Chironomus riparius*) et qu'une létalité apparaît dès la concentration minimale testée, de 10 µg.L^{-1} avec un temps moyen entraînant 50% de létalité (LT50) de quatre jours et demi à cette concentration. Par ailleurs, Felten et al. (2008) montrent que l'exposition chronique par voie dissoute au Cd (sept jours, 15 µg.L^{-1}) à un effet inhibiteur sur le taux de nutrition de *G. pulex* (-36%). Les effets toxiques chroniques à l'échelle de l'organisme ont des répercussions aux plus grandes échelles d'organisation du vivant, comme des effets populationnels (Maltby, 1999). Une méthode, liée à un modèle dit

du "scope for growth" (potentiel de croissance), consiste par exemple à mesurer le niveau d'alimentation, la respiration, l'excrétion fécale et l'efficacité d'absorption de la nourriture pour déterminer l'énergie disponible pour la croissance par un organisme dans différents environnements plus ou moins contaminés. Naylor et al. (1989) ont proposé d'utiliser cette approche pour relier la toxicité du Zn à l'échelle du gammare (*G.pulex*) aux effets sur la population : des gammares exposés à des concentrations en Zn entre 300 et 700 $\mu g.L^{-1}$ disposent d'une énergie moindre pour leur croissance, ce qui laisse présager des effets sur la population des métaux traces.

I.1.3.2 La biodisponibilité des métaux par la voie dissoute

La biodisponibilité et la toxicité d'un métal en solution sont diminuées par :

- La complexation des métaux par des ligands organiques dissous, sauf exceptions (Campbell, 1995)
- L'augmentation des concentrations en autres cations divalents (notamment alcalino-terreux, Ca et Mg) et du pH également (Pagenkopf, 1983; De Schamphelaere et Janssen, 2002). Stephenson et Mackie (1989a) ont montré, par exemple, que des ajouts de calcium diminuaient la bioaccumulation du Cd chez *Gammarus pulex* (*a fortiori* sa biodisponibilité) à 0,1 $\mu g.L^{-1}$.

Le modèle de l'ion libre

Depuis les travaux fondateurs (Anderson et al., 1978; Pagenkopf, 1983), on utilise le modèle de l'ion libre (free ion activity model, FIAM) ou bien le modèle du ligand biologique (biotic ligand model, BLM) pour interpréter bon nombre d'expériences sur la bioaccumulation et la toxicité des métaux dissous.

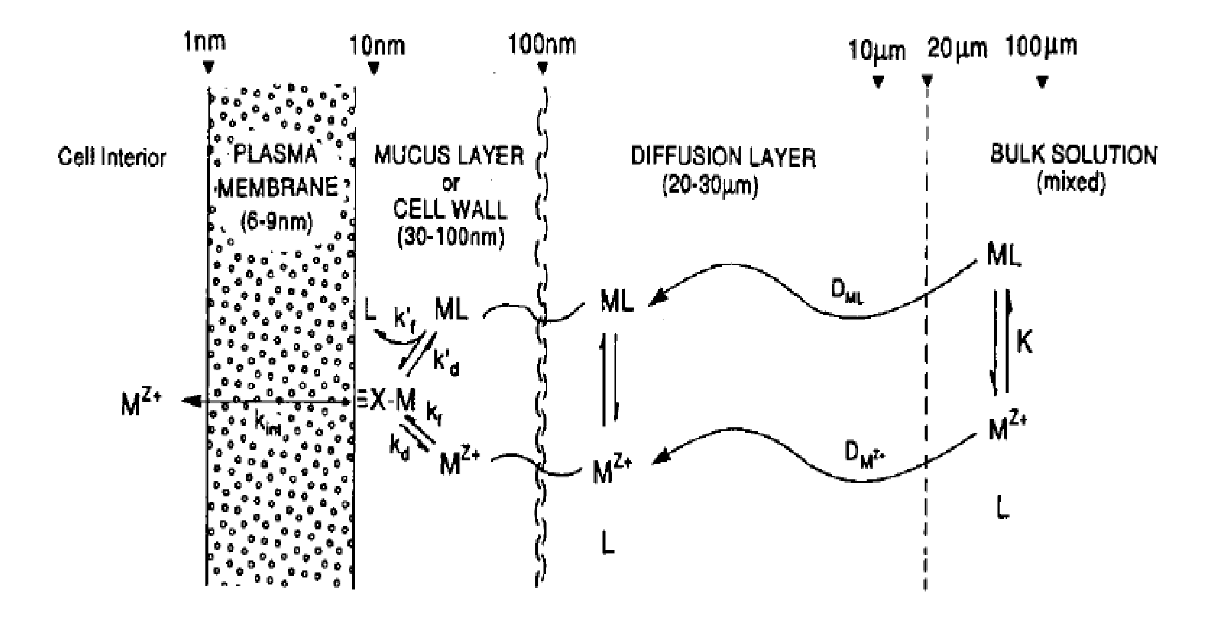


Figure 5 Schéma conceptuel de l'interaction entre les métaux traces et les organismes aquatiques. M^{2+} = ion libre; ML= complexe métallique en solution; M-X = complexe métallique à la surface biologique; k_f et $k_{f'}$ = constante cinétique de formation des complexes de surface, k_{int} = constante cinétique d'internalisation c'est-à-dire de transport intra-membranaire du métal (modifié de Tessier et al. in Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems (Lewis, 1994) Chap. 6).

Le FIAM, cf. schéma Figure 5, repose sur trois hypothèses fondamentales :

- l'effet toxique ou la bioaccumulation d'un métal sont proportionnels à une concentration surfacique en complexes métalliques au niveau des membranes biologiques,
- les équilibres chimiques sont établis entre l'ion libre en solution et ses différentes formes de complexation,
- La vitesse d'incorporation du métal par le biote (k_{int} sur la Figure 5) est plus lente que les vitesses de dissociation des complexes (Morel 1983)

Sous ces conditions, les variations de la bioaccumulation ou les résultats d'un test de toxicité en fonction de la contamination de la phase dissoute peuvent être rapportés aux variations de la concentration en ions libres en solution. En la matière, les ajouts de ligands organiques dissous diminuent cette quantité et en conséquence la biodisponibilité des métaux dissous. Par exemple il a été montré que la bioaccumulation du Cd après deux jours d'exposition chez *Daphnia magna* diminuait suite à des ajouts d'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) ou d'acide nitrilo-triacetic (NTA), de pyrophosphate ou d'acides humiques Aldrich

(Poldoski, 1979), ce qui peut être modélisé par le FIAM (Campbell, 1995). En revanche Poldoski (1979) a montré que l'ajout de diéthylthiocarbamate augmentait les teneurs en Cd bioaccumulées par rapport à la même exposition en milieu minéral. En effet, il arrive exceptionnellement que certains petits complexes organiques lipophiles des métaux, recensés par Campbell (1995), augmentent leur biodisponibilité, cas pour lesquels l'utilisation du FIAM n'est pas appropriée.

En outre les biotic ligand model (BLM) sont développés actuellement. Ces modèles prennent en compte les réactions de compétition des métaux avec les autres cations divalents et l'ion H^+ au niveau des ligands des métaux des surfaces biologiques. De plus, ils tiennent compte de l'effet de la spéciation des métaux en solution sur la biodisponibilité et la toxicité dans le cadre du FIAM. Un BLM a été développé pour prédire les variations de l'EC50 (la concentration ayant pour effet 50% d'immobilisation à deux jours) du cuivre dissous chez *Daphnia magna* en fonction des concentrations en Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^+ et K^+ de l'eau (De Schamphelaere et Janssen, 2002), ainsi que l'effet protecteur d'ajouts de matières organiques dissoutes naturelles de différentes origines et d'acides humiques (Ma et al., 1999; De Schamphelaere et al., 2004).

Pour ces modèles, l'hypothèse portant sur une limite de la vitesse d'internalisation des métaux par le biote est nécessaire. En effet si le biote incorpore le métal vite par rapport aux cinétiques des réactions de complexation en solution, ce sont les paramètres cinétiques de ces réactions qui vont limiter l'incorporation du métal et non plus un paramètre donné comme l'activité de l'ion libre (Anderson et Morel, 1982; Hassler et al., 2004). Dans le cas de l'internalisation du Cu par les bryophytes, par exemple, une modélisation plus poussée que celle du FIAM a été développée pour modéliser la bioaccumulation en présence de ligands organiques (Ferreira et al., 2008).

En résumé, la biodisponibilité par voie dissoute des métaux dépend de leur spéciation (dominée par la complexation par les ligands organiques en milieu naturel) et de la compétition cationique pour des sites de complexation des surfaces biologiques. Dans un contexte qui nécessite, entre autres hypothèses, l'équilibre des réactions de complexation en solution, l'influence de la spéciation des métaux sur leur biodisponibilité peut

s'interpréter en utilisant les modèles du FIAM et du BLM.

La labilité et la biodisponibilité des métaux

FIAM et BLM sont utiles pour interpréter les expériences en laboratoire où il est faisable de mesurer l'activité de l'ion libre. Sur le terrain, la mesure de l'ion libre en solution est en phase de mise au point méthodologique (Sigg et al., 2006; Unsworth et al., 2006). Les mesures actuelles de l'activité de l'ion libre sur le terrain ne sont comparables aux calculs des modèles de spéciation qu'en ordre de grandeur et que pour Cd^{2+} et Ni^{2+} (Unsworth et al., 2006). Pour Pb^{2+} et Cu^{2+} il existe des différences de plusieurs ordres de grandeur. Enfin, les causes des divergences entre modèle et mesure pour ces quatre métaux ne sont pas connues (Unsworth et al., 2006).

Il est donc légitime de se demander si la technique de la DGT, validée sur le terrain (Davison et Zhang, 1994), et dans d'autres contextes comme celui des eaux résiduaires urbaines (Buzier et al., 2006a; Buzier et al., 2006b), pourrait être utilisée dans le but de déterminer (prédire) la biodisponibilité d'un métal en solution. La concentration en métal labile est une fraction de la concentration totale dissoute excluant les complexes des métaux les plus difficiles à dissocier (le critère de labilité dépend du gel utilisé), comparable à celles mesurées par d'autres techniques moins évidentes à mettre en place (Meylan et al., 2004; Sigg et al., 2006). Sur le terrain, la concentration en métal labile intègre les variations en métal dissous dans l'eau, durant quelques heures à plusieurs jours (Meylan et al., 2004).

Il a été montré, dans certains contextes (selon l'organisme, le métal, et les conditions de spéciation du métal), qu'il était possible de prédire la biodisponibilité ou la toxicité d'une solution contaminée grâce à la mesure du métal labile par la technique DGT. Par exemple, il a été montré que la concentration en cuivre labile correspondait à celle qui, en présence de ligands organiques d'origine naturelle, s'accumule en surface des branchies de poisson (Luider et al., 2004). De même, cette concentration permet d’expliquer les variations de la toxicité aiguë du Cu dissous chez *Daphnia magna*, en présence de matières organiques dissoutes de différentes origines : acides humiques Aldrich, extraits d’algues fraîches et fanées (Tusseau-Vuillemin et al., 2004b).

En conclusion, la détermination de la biodisponibilité des métaux par voie dissoute reste un

champ de recherche ouvert et différentes manières d'aborder la question sont possibles selon le type de mesure chimique choisi (ponctuelle, intégrée) et selon la méthode d'analyse de la spéciation du milieu, faisant appel à la modélisation ou non.

I.1.3.3 Biodisponibilité des métaux et spéciation dans la nourriture

Une partie des métaux de la nourriture est absorbée par les invertébrés aquatiques, d'eau douce ou marine (Rainbow, 2007). Et la question de la biodisponibilité de ces métaux se décline selon les types de nourriture (algues, sédiments, feuilles, proie animale etc.). Pour un organisme donné et selon un type de digestion donné, on peut comparer la biodisponibilité d'un contaminant dans la nourriture en mesurant l'efficacité d'assimilation (AE pour assimilation efficiency en anglais) de ce contaminant par voie trophique. L'AE est la proportion de métal total dans l'alimentation qui traverse la paroi digestive lors du passage de la nourriture dans l'organisme (Wang and Fisher 1999).

Concernant les métaux présents dans et sur les algues, il a été montré que leur biodisponibilité dépend de la localisation cellulaire du métal. Les métaux du cytoplasme sont davantage biodisponibles que ceux attachés aux parois cellulaires. Ceci a été montré dans le cas de la digestion des algues par les copépodes marins, cf. Figure 6 en particulier pour le Se (Reinfelder et Fisher, 1991; Chang et Reinfelder, 2000), et chez les bivalves marins (Wang et al., 1996a; Reinfelder et al., 1997). Les résultats de ces études suggèrent, même, que les métaux liés aux parois cellulaires externes et aux membranes ne sont pas du tout biodisponibles ; ils seraient empaquetés dans les pelotes fécales et déféqués (Reinfelder et Fisher, 1991).

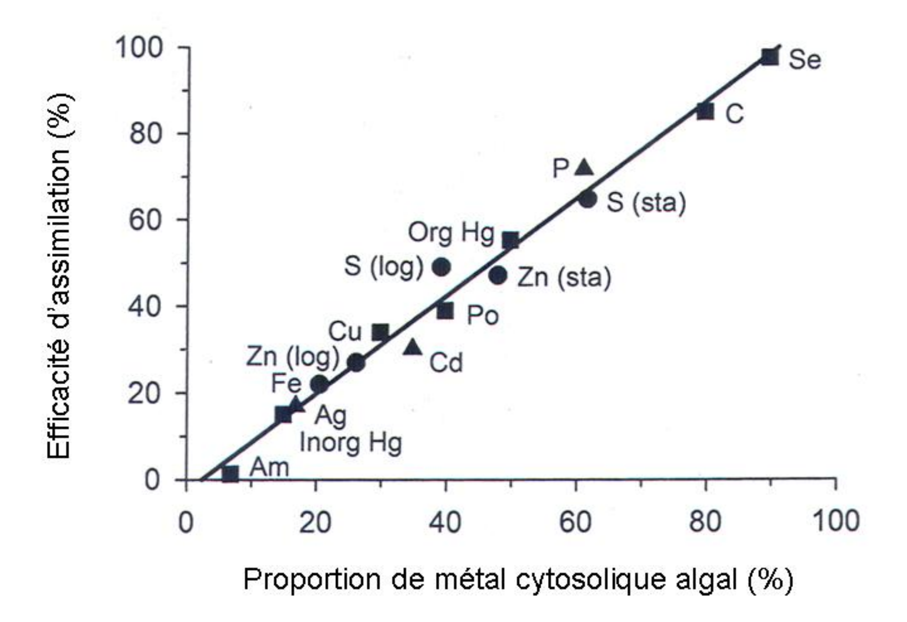


Figure 6 La relation linéaire entre l'efficacité d'assimilation des métaux ingérés par les copépodes marins via leur nourriture et la proportion de métal dans le cytoplasme de cette nourriture (algues *Thalassiosira pseudonana* ou *T. weissflogii* pour Cu et Hg). L'efficacité d'assimilation est une mesure de la propension des métaux contenus dans la nourriture à être assimilés lors de la digestion. Copépodes : *Acartia tonsa* (carrés), *A. hudsonica* (ronds), et *Temora longicornis* (triangles). Abrév. : (sta) phase stationnaire de la croissance des diatomées, (log) : phase logarithmique de la croissance des diatomées. Adapté de Meyer et al. (2005).

Concernant le sédiment, la fraction extractible à l'acide nitrique molaire a été proposée comme mesure de la teneur en métaux sédimentaires labiles (Bryan et Langston, 1992), et ce type de mesure a été utilisée pour prédire les données de bioindication issues d'analyse des *Macoma Balthica* (bivalve marin) dans le golfe de la Vistule (Sokolowski et al., 2001). Mais contrairement à la détermination du métal cytosolique des algues, cette méthode de détermination d'une fraction biodisponible des métaux n'a pas été validée sur un grand nombre de cas à notre connaissance.

Les caractéristiques du fonctionnement digestif interviennent dans le processus de bioaccumulation par voie trophique, ce qui peut compliquer l'étude de cette biodisponibilité. Chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*, Roditi et Fisher (1999) ont montré que l'AE des métaux dépendait du type d'algue ou de particules ingérées. Cependant, il n'est pas possible de comparer la biodisponibilité des métaux dans ces nourritures. En effet, il a été montré que plus le temps de rétention digestive des invertébrés est long, plus les métaux sont assimilables (Wang et al., 1996a; Wang et Fisher, 1999). Et, le fonctionnement de la digestion des bivalves adultes change en fonction du type de

nourriture : plus elle est nutritive, plus longtemps dure la digestion (Decho et Luoma, 1996). Donc, la biodisponibilité des métaux dans des nourritures de qualité nutritive très différente ne peuvent pas être comparée en se fondant sur des AE chez la moule.

En dépit de cette complexité, Wallace et Luoma (2003) proposent que la concentration en métal biodisponible par voie trophique, en toute généralité, ne dépend que la localisation biologique du métal dans la nourriture, selon le schéma Figure 7.

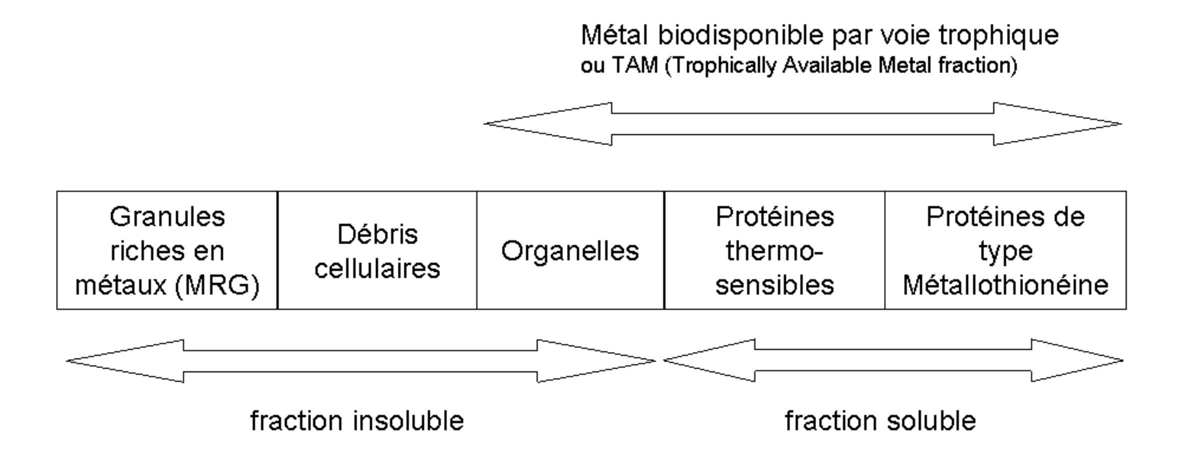


Figure 7 Schéma représentatif de l'hypothèse de Wallace et Luoma (2003) concernant la biodisponibilité des métaux en fonction de leur distribution cellulaire dans les proies ingérées par les invertébrés aquatiques. Les différentes fractions représentées sont définies de manière opérationnelle (différentes centrifugations et acidifications) selon le protocole de l'article cité.

Pour les autres matrices (feuilles, proies animales), de nombreux auteurs émettent l'hypothèse que la biodisponibilité des métaux varient selon leur localisation. Par exemple, on peut faire les hypothèses (i) que les métaux adsorbés en surface des feuilles sont davantage biodisponibles que ceux réellement assimilés par les feuilles (Croteau et al., 2007a) (ii) que les métaux de l'exosquelette des daphnies (en tant que proie) sont moins biodisponibles que ceux des tissus mous (Meyer et al., 2005).

I.1.4 Conclusions

La présence des métaux (Cd, Zn, Cu) dans le réseau hydrographique a décliné ces dernières années et la contamination actuelle de la Seine et de ses principaux affluents est souvent mesurée à des valeurs inférieures aux seuils réglementaires (comme nous l’avons décrit pour le Cd). Néanmoins, les sources de métaux en milieu urbain restent majoritairement

anthropiques et une contamination résiduelle perdure. Les métaux s'associent avec la matière organique dissoute de telle sorte que leur spéciation influence les réponses biologiques du milieu aquatique. Donc caractériser ces modifications de la biodisponibilité est nécessaire pour faire le lien entre exposition et bioaccumulation. Certains travaux montrent que la mesure du métal labile en solution permet de prédire la biodisponibilité des métaux par voie dissoute. Nous notons qu'ils sont moins nombreux que ceux validant le cadre interprétatif de la réactivité biologique de l'ion libre, les deux approches n'étant pas contradictoires *a priori*. Enfin, certains métaux, comme le Cd et le Se, sont bioaccumulés par voie trophique chez les invertébrés d'eau douce en général, dont les crustacés. De plus, cette voie de bioaccumulation est modulée par les formes chimiques du métal présent dans la nourriture.

I.2 LE CONTROLE BIOLOGIQUE DE L'EXPOSITION AUX METAUX DU MILIEU AQUATIQUE

A ce stade, les caractéristiques biologiques de l'entrée et de l'utilisation biologique des métaux doivent être décrites pour choisir l'angle sous lequel aborder le lien entre les conditions chimiques d'exposition et la bioaccumulation des métaux (en particulier celle du Cd). Aussi, dans cette seconde partie, nous proposons de décrire le contrôle biologique des échanges de métaux chez *G. pulex*.

I.2.1 Notions de biologie des gammares utiles à cette étude

I.2.1.1 Morphologie de *Gammarus pulex*

Gammarus pulex (Linnaeus, 1758) fait partie des amphipodes, qui sont les crustacés dont les pattes sont dirigées, les unes vers l'avant, les autres vers l'arrière[5]. Leur corps présente une symétrie bilatérale et un aplatissement latéral. Leur taille adulte est d'environ 15 mm et ne dépasse généralement pas 20 mm (Tachet et al., 2000). Les gammares de taille inférieure ou égale à 5 mm sont considérés comme juvéniles. C'est une définition en partie opérationnelle

[5] par opposition furent nommés les isopodes, ceux dont les pattes locomotrices ont toutes la même direction.

proposée par V. Felten, et c'est la taille en dessous de laquelle il devient difficile de distinguer mâles et femelles.

Ils sont recouverts d'un exosquelette appelé cuticule. Cette carapace est renouvelée périodiquement (cycle d'environ 25 j), partant d'une base en chitine (ou glycoaminoglycane) se durcissant progressivement par calcification, c'est-à-dire par ajouts de phosphate de calcium et de carbonate de calcium (Gagné et al., 2005). On distingue couramment trois parties de leur corps : le protosoma (la tête, faite d'une seule pièce d'exosquelette appelée céphalon), le métasoma (l'ensemble des segments formant une convexité dorsale régulière), et l'urosoma (la partie la plus antérieure). V. Felten (2003) détaille les appendices et pièces buccales du protosoma, dont un schéma d'ensemble est reproduit ci-dessous pour montrer la place des appendices masticateurs. Les mandibules, par exemple, permettent aux gammares d'inciser des pièces de nourriture. Elles sont fixées sur la tête antérieurement aux antennes et antennules (Figure 8). Les antennes constituent, elles, des appendices sensoriels du gammare. Les gammares sont pourvus d'ocelles (des yeux) sensibles, au moins, à la luminosité.

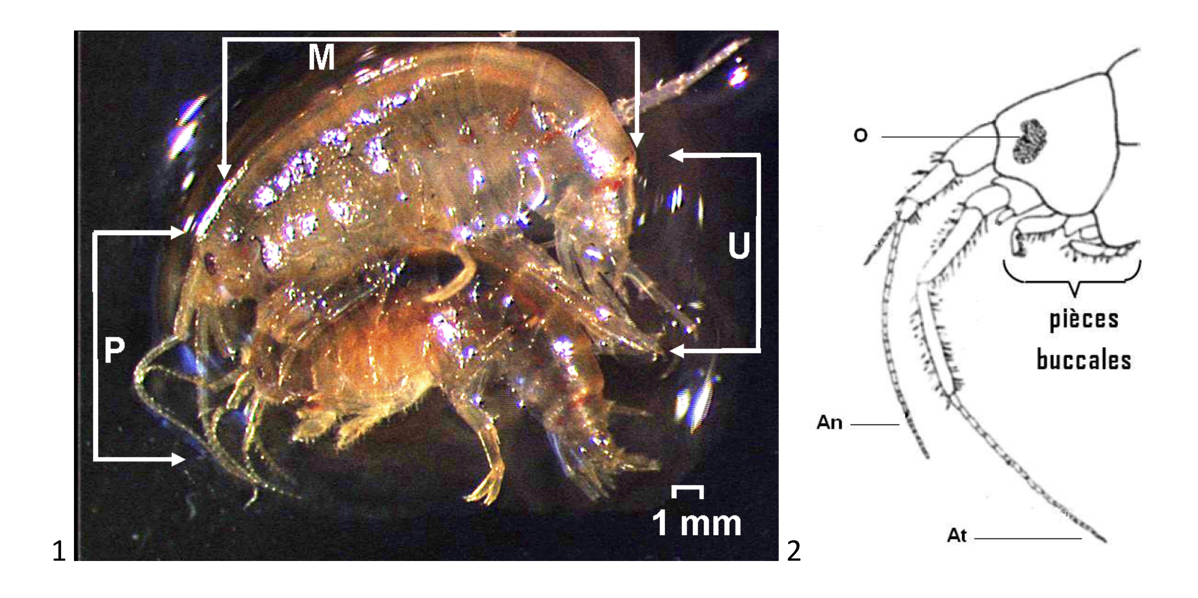


Figure 8. Présentation graphique du gammare. 1. Photo d'un couple de *Gammarus pulex*. Détail de la morphologie du mâle : P (Protosoma), M (Métasoma), U (Urosoma). 2 Dessin anatomique du céphalon des gammares (issu de la thèse de Felten (Felten, 2003)) montrant les organes buccaux. O : ocelles, An : Antennules, At : Antennes.

En première approche et à l'œil nu les espèces *Gammarus pulex* et *G. fossarum* se distinguent d'une bonne partie des autres espèces de gammares grâce à trois critères

morphologiques simples :

- Ils ont les segments dorsaux non carénés et lisses (sans aucune expansion),
- ils n'ont pas d'antennules "naines", c'est-à-dire d'antennules très courtes par rapport aux antennes,
- ils n'ont pas de soies nombreuses ou apparentes à l'œil nu. Ces soies peuvent être longues ou fournies sur les parties antérieures du corps de certains autres gammares, elles sont microscopiques chez *G. pulex* et *G. fossarum*.

I.2.1.2 Biologie et écologie

G. pulex est épibenthique c'est-à-dire vivant au –dessus et en surface du sédiment. Il choisit des habitats d'architecture complexe, tels les raviers ou bancs de graviers couverts de macrophytes, afin de se prémunir de ses prédateurs. Ce sont les caractéristiques physiques et chimiques de l'eau, et non du sédiment, qui influencent principalement leur présence et leur densité. Les gammares sont sensibles aux variations de pH et leur survie nécessite une teneur en dioxygène dissous d'au moins 7 $mg.L^{-1}$. Les préférences et les limites physico-chimiques (statistiques) des habitats choisis par *Gammarus pulex* ont été synthétisées par Peeters et Gardeniers (1998). De manière exceptionnelle, *G. pulex* peut devenir abondant dans les mares, les étangs (quand peu de poissons viennent s'y nourrir) et les lavoirs. Leur activité est alors moins clandestine et le caractère lucifuge (ils fuient la lumière du soleil) moins prononcé. Dans tous les cas, ils sont également psychrophiles, c'est-à-dire exerçant une nette préférence pour les basses températures de l'eau, ce qui explique, en été, leur enfouissement dans les lits de graviers. Enfin, leur durée de vie serait limitée à vingt-quatre mois (Tachet et al., 2000) et peut être plus courte selon l'intensité de l'étiage ou à cause de période de forte température, ce dernier facteur étant connu pour réduire leur durée de vie.

Gammarus pulex appartient au groupe fonctionnel trophique des déchiqueteurs, il participe à la décomposition de la litière des rivières, en mordant par exemple dans les parties les moins fermes de résidus de feuilles (Moss, 1980). Cette fonction est essentielle au fonctionnement écologique des cours d'eau en tête de bassin versant puisque qu'elle génère de la matière organique particulaire fine à partir des apports en débris végétaux, nourrissant

ainsi de nombreux autres consommateurs, cf.Figure 9.

Figure 9 Modèle de structure trophique des écosystèmes d'eau douce faisant ressortir certains groupes fonctionnels trophiques et l'importance de la fragmentation de la litière (flèche grise) par les déchiqueteurs. Les flèches noires pointent en direction du maillon trophique supérieur. (Adapté de Cummins et al. (1973) avec quelques illustrations du Marine Zooplankton Ecology Group, CSIC, Barcelona, Espagne, avec leur aimable autorisation).

L'espèce native (i.e. naturellement présente) de gammares dulcicoles la plus commune en France est *Gammarus pulex* (Meyran et al., 1997). Parmi les autres espèces françaises, notons que l'espèce invasive *Dikerogammarus villosus* prend le pas sur *Gammarus. pulex* de manière croissante (Bollache et al., 2004), ce dernier étant davantage prédateur que déchiqueteur. L'espèce *Gammarus pulex* et l'espèce *Gammarus fossarum* (du degré de proximité le plus élevé du point de vue morphologique et phylogénétique (Meyran et al., 1997), ne sont pas distinguées dans cette étude où, pour des raisons pratiques, une reconnaissance simplifiée de la taxonomie des gammares a été utilisée. L'étude de Peeters et Gardeniers (1998) montre la similitude des deux espèces sur le plan hydrobiologique. Sur le plan écotoxicologique, nous supposerons que les deux espèces ne présentent pas de différences majeures.

I.2.1.3 Nage, déplacement, migration

Les gammares se placent couramment sur la tranche pendant la locomotion, on dit qu'ils "nagent de coté". Ils sont également capables d'autres types de mouvements, comme par exemple un déplacement brusque par contraction/étirement de leur corps.

A l'instar de tout le benthos, les gammares sont d'abord soumis à une dérive descendante due au courant, contre laquelle ils nagent en permanence vers l'amont, c'est la contre-dérive. Malgré cette nage, il existe une dérive des gammares par mise en suspension des individus lors des crues (dérive catastrophique). Une tendance secondaire existe pour une dérive comportementale vers l'aval (Elliott, 2002), se déroulant plutôt de nuit (Muller, 1963), mais la dérive moyenne annuelle des gammares s'explique principalement par une dizaine d'évènements catastrophiques consécutifs à des pointes de débit.

La mobilité longitudinale des gammares est aussi caractérisée par une migration vers l'amont dont les caractéristiques restent bien moins connues que les dérives. Plusieurs observations de cette mobilité furent réalisées par Goedmakers et Pinkster (1981) et précédemment par les études passées en revue par Zaugg (1997). Goedmakers et Pinkster (1981) ont observé sur trois années consécutives cette mobilité ascendante se déroulant entre les mois de juin et d'août, à des vitesses de l'ordre de 14 m par jour. Elle implique des mouvements importants diurnes alors que les gammares sont lucifuges. De l'ordre d'un kilomètre peut être parcouru au total par un individu par migration (Zaugg, 1997), ce qui représente une distance de mobilité exceptionnelle pour les invertébrés aquatiques. Des observations ponctuelles de vitesse de nage vers l'amont atteignent 40 m par heure chez *G. fossarum* ! Cette migration vers l'amont pourrait être liée avec le cycle reproducteur du gammare et constituer une stratégie de recolonisation (Rawer-Jost et al., 1998). Certains auteurs pensent aussi que ces migrations compensent la dérive entre la fin d'un été et l'été suivant (Zaugg, 1997).

En résumé, deux phénomènes caractérisent la mobilité longitudinale des gammares dans un cours d'eau:

- une ascension permanente qui leur permet de se maintenir à une station donnée, sauf dans le cas des plus intenses pointes annuelles de débit au cours desquelles une partie de la population peut-être emportée vers l'aval.

- durant l'été les gammares migrent vers l'amont sur une distance de l'ordre de quelques centaines de mètre.

En conclusion, les gammares d'une station sont représentatifs d'une partie du réseau hydrographique de quelques centaines de mètres vers l'aval (notamment en fin d'été où ils ont migré depuis l'aval) et vers l'amont (notamment après une crue de fréquence de retour annuelle).

I.2.1.4 Nutrition

Les gammares sont opportunistes du point de vue nutritionnel, ils se nourrissent de ce qu'ils trouvent facilement parmi un spectre trophique particulièrement large (débris d'animaux morts, végétaux en décomposition, champignons, algues). Fielding et al. (2003) notent, par exemple, que les gammares se nourrissent par prédation de chironomes morts ainsi que d'aselles juvéniles vivantes. D'autres études montrent cependant que les gammares se nourrissent principalement de feuilles mortes disséminées dans les cours d'eau par la végétation riparienne, et principalement des feuilles qui subissent une dégradation sous l'effet des biomasses microbienne et fongiale (Moss, 1980; Graca et al., 1993a). On pourra noter que l'infection par le parasite *Echinorhynchus truttae* réduit la capacité des gammares à capturer leurs proies (relativement à leur nombre et à leur taille) et donc modifie leur nutrition (Fielding et al., 2003). Leur type de nutrition couvre donc trois classes : détritivore, prédateur et herbivore.

Une nutrition sélective

Les gammares choisissent leur nourriture, notamment en fonction du degré de décomposition de la matière organique (Moss, 1980; Graca et al., 2001; Felten, 2003). Cette sélection se fait à partir de signaux de décomposition de la matière organique, émis par la biomasse bactérienne et fongiale (Graca et al., 1993a; De Lange et al., 2005). De Lange et al. (2005) montrent, par exemple, que *Gammarus pulex* se désintéresse de feuilles ayant subi un processus de décomposition mais étant nettoyées de leur biomasse bactérienne et fongiale. Une fois la nourriture en décomposition sélectionnée, c'est bien la feuille qui constitue la nourriture de *Gammarus pulex* et non la biomasse bactérienne et fongiale

(Graca et al., 1993a).

De plus, Wilding et Maltby (2006) ont montré que la contamination en Zn de la nourriture (3 $mg.g^{-1}$ de Zn contre 1 $mg.g^{-1}$ dans les feuilles contrôles) provoquait une baisse du taux de nutrition d'environ 30%. L'évitement de la nourriture contaminée en Zn est une réponse comportementale, qui cesse dès que la nourriture proposée n'est plus contaminée, contrairement à la baisse du taux de nutrition provoquée par une exposition au Zn par voie dissoute et qui relève d'un phénomène de toxicité (Wilding et Maltby, 2006).

Taux de nutrition, sous influence notamment de la température

Le taux de nutrition de *G. pulex* est très variable, il se situe dans la fourchette 0,04 - 0,4 $mg.mg^{-1}.j^{-1}$ (Maltby et al., 2002), où le poids des matières, nourritures et organismes, est mesuré par pesée poids sec (NB : par défaut c'est ainsi que seront exprimés les miligrammes de nourriture, d'organismes et de fèces dans tous le texte). Cette variabilité s'explique en partie du fait de l'influence de la qualité de la nourriture sur le taux de nutrition. En milieu non-contaminé,au laboratoire, et à température de 11°C (optimum de température de vie de *G. fossarum*), Felten (2003) observe des variations du taux de nutrition entre 0,1 et 0,4 $mg.mg^{-1}.j^{-1}$ en fonction de type de feuille et de leur degré de décomposition (la décomposition varie entre des temps de conditionnement des feuilles de quinze et quarante-cinq jours, nous n'avons pas pris en compte les feuilles conditionnées durant deux jours, qui sont évitées).

La variabilité du taux de nutrition s'explique aussi du fait de l'influence de la température. Maltby et al. (2002) ont étudié précisément l'influence des paramètres physico-chimiques (température, salinité et contamination globale du site) sur le taux de nutrition de *Gammarus pulex*. La température est responsable de 75% de la variation des taux de nutrition des gammares déployés dans les sites non-contaminés. A 6°C le taux de nutrition tombe à 0,04 $mg.mg^{-1}.j^{-1}$, plus faible d'un ordre de grandeur environ que celui à 16 °C.

I.2.1 La bioaccumulation des métaux par les crustacés d'eau douce (en particulier les gammares)

I.2.1.1 Teneurs en métaux nécessaires physiologiquement

Les organismes aquatiques utilisent de nombreux métaux pour vivre. Il s'agit principalement de Ca, Mg et Fe, utiles à la respiration et à la constitution du squelette, mais aussi Cu et Zn utilisés comme cofacteurs de nombreuses enzymes (White et Rainbow, 1985) ainsi que le Mo (molybdène) et le Se (sélénium). Ces métaux sont dits essentiels. Leurs teneurs dans les organismes ne varient pas ou très peu quelques soient les variations des concentrations dans le milieu, entre les seuils de carence et d'apparition de toxicité, car ils sont régulés par les mécanismes physiologiques spécifiques participants à l'homéostasie (Rand, 1995; Rainbow, 2002).

Une teneur métabolique basale peut être estimée soit expérimentalement, soit théoriquement sur la base de la quantité d'enzymes utilisant chaque métal selon les familles de crustacés. Par exemple, 83 $\mu g.g^{-1}$ de Cu et 70 $\mu g.g^{-1}$ de Zn sont nécessaires dans le métabolisme des crustacés marins tels que les crabes, les crevettes et les homards marins (White et Rainbow, 1985; Rainbow, 2002). Concernant les gammares d'eau douce, plusieurs études expérimentales montrent que ceux des sites les moins contaminés contiennent des teneurs proches de 75 $\mu g.g^{-1}$ de Cu et de 80 $\mu g.g^{-1}$ de Zn (Rainbow et Moore, 1986; Bascombe et al., 1990; Plenet, 1995). Ceci n'empêche pas qu'au-delà de certains niveaux de contamination de l'eau ou de la nourriture les métaux essentiels puissent être bioaccumulés ou même toxiques (Rainbow, 2002). Par exemple, des concentrations en Zn dissous supérieures à 100 $\mu g.L^{-1}$ ou en Cu dissous supérieures à 80 $\mu g.L^{-1}$ provoquent de la bioaccumulation de ces métaux chez l'amphipode marin *Echinogammarus pirloti* (Rainbow et White, 1989), et 100 $\mu g.L^{-1}$ de Cu est la LC50 à 96h chez *Gammarus pulex* (Guven et al., 1999).

On ne sait encore pas si le Ni est essentiel ou non chez les invertébrés aquatiques contrairement aux plantes aquatiques ou aux invertébrés terrestres pour lesquels il l'est (Chowdhury et al., 2008). Le niveau métabolique requis serait alors probablement très faible comparé à celui du Cu et Zn car le Ni est utilisé par au moins dix à cent fois moins d'enzymes que le Cu et le Zn respectivement (lorsqu'il est essentiel) (Chowdhury et al., 2008). En revanche les métaux Pb, Cd, Ag et As ne sont pas utilisés par les processus biologiques en général, et *a fortiori* ceux des gammares. A notre connaissance, une seule exception

d'utilisation du Cd par une enzyme des diatomées marines subissant une forte carence en Zn a été montrée (Lane et Morel, 2000).

Les métaux peuvent être bioaccumulés par les invertébrés d'eau douce par voie dissoute ou par voie trophique (Rainbow, 1997). Il a été montré en laboratoire que le Cd est accumulé par ces deux voies chez *Gammarus fossarum* (Abel et Bärlocher, 1988). Nous examinons en premier lieu la voie dissoute et en second la voie trophique, la matrice d'exposition et les mécanismes biologiques étant spécifiques de chacune des voies.

I.2.1.2 Voie dissoute d'accumulation du Cd dans les gammares

Un gammare de 10 mg filtre environ 0,16 L d'eau par jour pour puiser l'oxygène nécessaire à sa respiration (Abel et Bärlocher, 1988). Les échanges gazeux chez les amphipodes s'effectuent principalement au niveau des membranes branchiales (situées sur le coté intérieur de ses pattes thoraciques), et de manière marginale à travers l'ensemble du corps (Felten, 2003). Par contact des branchies et des parties externes du corps avec de l'eau contaminée en Cd, ce métal s'accumule dans leurs tissus (Musko et al., 1990; Stuhlbacher et Maltby, 1992).

De surcroît, il a été observé que des *G. pulex* moribonds (traitement chimique) accumulaient 80% de Cd en moins que ceux vivants (Wright, 1980). On estime donc que le Cd pénètre principalement dans *G. pulex* par un (ou des) mécanisme(s) de transport inter-membranaires (cette fonction nécessite la vie des organismes), comme c'est le cas en général chez les crustacés (Phillips et Rainbow, 1993).

Remarque

La diffusion à travers les branchies et la cuticule pourrait jouer un rôle dans la bioaccumulation mais il n'est pas prépondérant. La cuticule est perméable à l'eau avant son durcissement par calcification, et laisse donc diffuser les métaux plus facilement dans les premiers stades du cycle de mue. Après calcification, les métaux peuvent s'adsorber sur la cuticule mais ne sont pas transportés dans les parties molles (Rainbow, 1997). Enfin des mécanismes d'endocytose comme la macropinocytose (évagination de la membrane cellulaire qui permet l'accumulation accélérée de solutés extracellulaires) peuvent être impliqués (Rainbow, 1997).

Une partie au moins du transport de Cd est commun avec celui du Ca^{2+}. En effet, il a été montré que :

- La dureté de l'eau influence la toxicité du Cd chez *G. pulex* (Abel et Bärlocher, 1988),
- des concentrations croissantes en Ca^{2+} réduisent fortement la concentration en Cd dans l'hémolymphe des *G. pulex* exposés au Cd (Wright, 1980),
- les vitesses d'accumulation du Cd sont plus fortes chez les gammares en premier stade du cycle de mue, période où l'assimilation de calcium est maximale du fait du processus de calcification (Wright, 1980). Cependant, ce dernier résultat peut être expliqué soit par l'existence d'un mécanisme de transport commun à Cd et Ca, soit par l'influence des changements de perméabilité de la cuticule.

L'ion Ca^{2+} pénètre dans les crustacés via des canaux ioniques spécifiques (Phillips et Rainbow, 1993). Le fait que les rayons atomiques du Cd et du Ca soient presque égaux (0.9 angströms) favoriserait le passage du Cd par les canaux calciques. Et de nombreux résultats, dans le contexte plus large de l'accumulation du Cd chez les invertébrés, mènent à penser que les canaux calciques sont empruntés par le Cd (Simkiss et Taylor, 2001; Croteau et Luoma, 2007b).

L'entrée du Cd par voie dissoute dépend donc de certaines caractéristiques physico-chimiques de l'eau que nous appellerons dans la suite des facteurs de contrôle de la

bioaccumulation du Cd. La concentration en calcium dissous en est un, dans la mesure où elle influence le lien entre la concentration en Cd dissous et la bioaccumulation par les gammares. D'autres paramètres physico-chimiques peuvent influencer la bioaccumulation du Cd par voie dissoute chez *G. pulex* :

- Il existe un effet antagoniste entre les accumulations de Zn et Cd dans la bactérie marine *Bacillus firmus* car ces deux métaux sont internalisés via des canaux calciques (Chen et al., 2008). Cependant les mécanismes de transport du Zn et du Ca sont *a priori* indépendants chez les gammares, ceci ayant été montré chez d'autres crustacés (Rainbow et Black, 2005). A notre connaissance, il reste donc à voir si une interaction entre l'accumulation du Cd et du Zn existe, et si la concentration en Zn est un facteur de contrôle de la bioaccumulation du Cd.
- deux études (concernant des insectes aquatiques) ont montré que des augmentations de température de l'eau faisaient augmenter les cinétiques de bioaccumulation du Cd par voie dissoute : chez la larve de Chironome par voie dissoute seule (Bervoets et R. Blust, 1996) ou la bioaccumulation globale chez *Chaoborus sp*. (Croteau et al., 2002). Comme par ailleurs, une corrélation a été établie par Zauke (1982) entre les teneurs en Cd des gammares *in situ* et la température de l'eau, on peut émettre l'hypothèse que la température est aussi un facteur de contrôle de la bioaccumulation du Cd chez *G. pulex*.

I.2.1.3 Voie trophique de bioaccumulation

L'importance de la voie trophique pour la bioaccumulation de certains métaux chez les invertébrés aquatiques a été montrée par de nombreuses études récentes, revues dans l'ouvrage de Meyer et al. (2005) et par Wang et Fisher (1999). Dans le cas général, le flux de contaminants entrants dans les invertébrés par voie trophique s'ajoute simplement au flux entrant par voie dissoute (les deux voies n'interagissent pas). Ceci a été vérifié, par exemple, lors de la bioaccumulation du Cd chez *Daphnia magna*, en utilisant un protocole permettant de comparer une entrée du Cd par voie dissoute à faible concentration (de l'ordre du $\mu g.L^{-1}$) et une entrée par voie trophique générée par une contamination des algues cohérente avec la contamination de l'eau choisie (Geffard et al., 2008).

Les deux voies étant additives, la voie trophique peut, théoriquement, être étudiée et quantifiée indépendamment de la voie dissoute. Cette démarche est même nécessaire dans le but de dépasser la problématique de la comparaison avec la voie dissoute et d'en caractériser les mécanismes (Wang et Fisher, 1999). Le flux d'entrée de métal par la seule voie trophique dépend de trois facteurs : le taux d'ingestion de la nourriture (IR en $g.g^{-1}.j^{-1}$), la capacité du crustacé à absorber les métaux de la nourriture et la biodisponibilité du métal dans la nourriture (Meyer et al., 2005).

Nous avons vu que la biodisponibilité des métaux dans les algues (et dans une moindre mesure dans les sédiments) pouvait varier et être caractérisée. Le transfert de métal de la nourriture vers le crustacé peut-être quantifié en termes d'efficacité d'assimilation (AE). AE est définie comme le pourcentage de métal ingéré qui traverse la paroi digestive (Wang et Fisher, 1999). C'est un paramètre essentiel pour la caractérisation des apports par voie trophique dans le modèle biodynamique de bioaccumulation des métaux. Dans ce cadre, le flux de bioaccumulation par voie trophique I (en $\mu g.g^{-1}.j^{-1}$) est décrit par l'Équation 3 :

Équation 3

$$I_f = IR.AE.[M]_f$$

où IR est le taux d'ingestion ($\mu g.g^{-1}.j^{-1}$), AE est l'efficacité d'assimilation (en %) et $[M]_f$ la concentration en métal total dans la nourriture ($\mu g.g^{-1}$).

Par rapport aux bivalves (en particulier marins) ou aux copépodes, la voie trophique de bioaccumulation des métaux a été peu étudiée chez les amphipodes, bien que l'on connaisse dans le cas du *G. pulex*, de nombreuses subtilités sur son comportement alimentaire. Malgré cela, chez cet amphipode, les expériences de Abel et Bärlocher (1988) ont montré que le Cd ingéré par l'alimentation (entre 100 et 2500 $\mu g.g^{-1}$ de Cd dans des champignons colonisant des disques de feuilles de chêne) donnait lieu à une bioaccumulation de Cd (et à de la mortalité). Ceci démontre la possibilité de la bioaccumulation du Cd par voie trophique. A notre connaissance aucune quantification n'existe pour ce type de bioaccumulation des métaux (Cd, Cu, Zn) chez les amphipodes d'eau douce. En revanche chez *Mysis relicta*, un mysidacé carnivore, crustacé d'eau douce de même taille et phylogénétiquement proche des

amphipodes, une telle quantification existe en terme d'efficacité d'assimilation (Smokorowski et al., 1988). Cette étude indique que 72% du Cd bioaccumulé par les daphnies est assimilé par voie trophique chez *Mysis relicta* (leur prédateur). Elle donne également une estimation de l'efficacité d'assimilation du Cu par voie trophique au cours de la même expérience, qui serait autour de 20% (estimation dans ce cas à cause d'une perturbation par voie dissoute). Aussi, *Daphnia magna* assimile entre 25% et 35% du Cd présent dans les algues qu'elles consomment (Yu and Wang, 2008). Le Cd et le Cu sont donc tous deux susceptibles d'être assimilés par voie trophique par les crustacés d'eau douce.

Enfin, cette voie de bioaccumulation des métaux est plus difficile à étudier que la voie dissoute. Deux raisons principales expliquent cela : d'une part l'étude séparée de ces deux voies s'avère difficile (contaminer les particules de nourriture établit inéluctablement un équilibre chimique avec une contamination de l'eau ce qui fait perdre l'indépendance de la caractérisation de la voie trophique), et d'autre part, le taux d'ingestion (paramètre clef de la dynamique de contamination par voie trophique) n'est ni aussi permanent, ni ne s'impose de la même manière que la ventilation respiratoire (Luoma and Fisher 1997, Munger and Hare 1997 ; Rheinfelder 1998). Dans le cas des amphipodes par exemple, à trop contaminer la nourriture on provoque dans certains cas une aversion du crustacé pour celle-ci (Wilding et Maltby, 2006).

En conclusion, on ne sait pas encore dans quelle proportion et suivant quelles caractéristiques les métaux de la nourriture sont bioaccumulés par les amphipodes d'eau douce, bien que la possibilité de contamination par cette voie trophique ait été mise en évidence chez *G. fossarum* (en Cd) et que des quantifications des flux de métaux (Cd et Cu) entrants par voie trophique existent chez d'autres crustacés d'eau douce. L'étude de la voie trophique indépendante de la voie dissoute est nécessaire à une caractérisation des facteurs de contrôle de celle-ci. Une première étape dans cette caractérisation est de distinguer l'influence du taux d'ingestion (IR) et de la contamination de la nourriture (teneur total en métal) sur le flux d'entrée global par voie trophique. Ce type de modélisation des apports par voie trophique, repris dans le cadre du modèle biodynamique, fait apparaître un troisième terme, l'efficacité d'assimilation (AE), qui transcrit l'influence de la physiologie digestive du crustacé étudié sur l'assimilation des métaux.

I.2.1.4 Distribution et élimination du Cd chez les gammares

Une fois internalisés, les métaux essentiels se distribuent dans l'organisme en fonction des besoins métaboliques. Les métaux essentiels en excès (par rapport aux besoins métaboliques) et les métaux non-essentiels vont, eux, être pris en charge par une réponse spécifique de l'organisme (dite « stratégie »). Très schématiquement, soit les organismes détoxiquent cette concentration en métal internalisé excédentaire, soit il la régule (Phillips et Rainbow, 1989; Rainbow, 2002).

- La détoxication est le processus biochimique par lequel des formes biologiques du métal potentiellement toxiques sont rendus non-toxiques (Phillips et Rainbow, 1989),
- La régulation du métal excédentaire consiste en une rapide adaptation du fonctionnement des transporteurs du métal (quand il en existe) pour que le métal soit éliminé plus rapidement qu'auparavant (Rainbow, 2002). A *priori,* cette stratégie ne s'applique donc pas aux métaux non-essentiels.

De manière plus approfondie, les stratégies de prise en charge des métaux dépendent de chaque métal, de chaque espèce (Rainbow et White, 1989) et de la voie d'entrée du métal (Rainbow, 2002). Rainbow (2002), distingue ainsi quatre stratégies possibles pour les métaux essentiels et deux pour les métaux non-essentiels. Deux phénomènes expliquent cette complexité. Premièrement, pour les métaux essentiels, la stratégie de la régulation peut être limitée par un seuil critique au niveau de l'exposition. Un exemple de l'existence de ce seuil est donné par Rainbow et White (1989) montrant que la teneur interne en Zn (de 79 $\mu g.g^{-1}$) restait constante chez un décapode marin (*Palemonetes elegans)* exposés à des concentrations en Zn dissous allant de 0,5 à 316 $\mu g.L^{-1}$, et qu'en revanche au-delà de ce seuil, les teneurs croissent proportionnellement au Zn dissous (teneurs à 21 jours). Il existe donc une stratégie hybride de type «régulation couplée à de la détoxication». Deuxièmement, pour les métaux essentiels et non essentiels, la capacité et la vitesse à laquelle un métal détoxiqué peut être excrété dépend de la forme biochimique sous laquelle il est détoxiqué, d'où l'existence de deux stratégies pour les métaux non-essentiels et d'une richesse encore plus grande dans le cas des métaux essentiels.

Les invertébrés aquatiques détoxiquent les métaux en excès sous deux formes biochimiques

: les métaux pris en charge par les protéines de type métallothionéine et ceux stockés dans des granules (Ionan Marigómez, 2002). Ces granules sont également appelés granules riches en métaux (MRG - Metal Rich Granules)[6] et sont excrétés très lentement, voire pas du tout, par les organismes, contrairement aux métaux piégés par les protéines de type métallothionéine qui finissent toujours par être excrétés (Rainbow, 2002).

Sans qu'il existe, à notre connaissance, d'étude spécifique portant sur les types de prise en charge des excès de Cd, Zn, Cu, Ni ou Pb chez *G. pulex*, nous pouvons les déduire des travaux antérieurs pour Zn et Cd. Le Zn peut être bioaccumulé chez *G. pulex* jusqu'à des teneurs de 400 $\mu g.g^{-1}$ (Bascombe et al., 1990; Xu et Pascoe, 1993) et le Cd jusqu'à 500 $\mu g.g^{-1}$ (Abel et Bärlocher, 1988). De plus, il a été montré que le Cd et le Zn bioaccumulés par voie dissoute chez *G. pulex* sont détoxiqués, au moins en partie, dans des protéines de type métallothionéine (Stuhlbacher et Maltby, 1992). On en déduit que le Cd et le Zn sont bioaccumulés par détoxication chez *G. pulex* et que, si il existe une régulation pour le Zn, elle serait insuffisante à partir d'une concentration supérieure à 450 $\mu g.L^{-1}$, seuil reconnaissable grâce aux données de Xu et Pascoe (1993). Enfin, il est plausible que *G. pulex* utilise un mécanisme de détoxication par MRG (en plus des métallothionéines) pour détoxiquer le Cd accumulé. En effet, il a été montré chez un autre amphipode d'eau douce (*G. fasciatus*) que plus du trois-quarts de la teneur en Cd – contenu digestif non compris- était localisé dans l'hépatopancréas (Amyot et al., 1996). Cette glande (HPC sur la Figure 10) est reliée à la partie médiane de son tube digestive, et, chez les gammares marins, sert à l'excrétion de nombreuses substances dont le Cu et le Zn et à la détoxication du Cd (Nassiri et al., 2000).

[6] Ils ont été évoqués au chapitre sur la biodisponibilité des métaux par voie trophique.

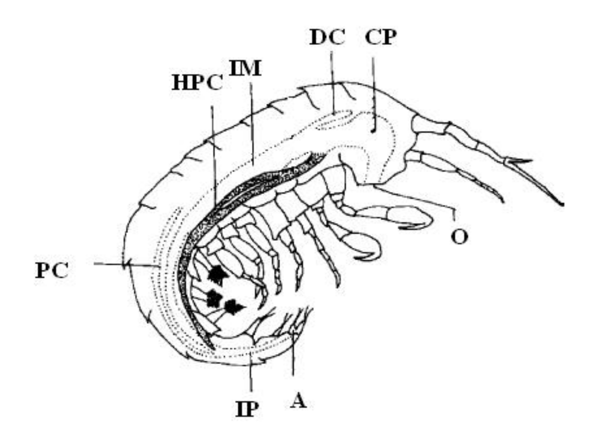


Figure 10 Localisation de la glande hépatopancréatique chez les gammares, schéma de Kutlu et al. (2002). O, œsophage ; CP, chambre pylorique ; DC, cæcum dorsal antérieur ; IM, intestin moyen ; HPC, glande hépatopancréatique ; PC, cæcum postérieur ; IP, intestin postérieur ; A, anus.

Le Cd détoxiqué dans l'HPC des gammares marins semble ne pas être excrété (Nassiri et al., 2000), mais Zn et Cu, eux, sont incorporés dans des granules riches en métaux, puis rassemblés dans des lysosomes qui exportent lentement le MRG vers le tube digestif (Correia et al., 2002). De plus, il a été montré que le Pb est également rapidement stocké puis excrété par *G. pulex* par la voie métabolique de MRG dans l'HPC (Kutlu et al., 2002). Ceci, et le fonctionnement de cette glande chez les gammares marins, mène à penser qu'il pourrait bien en être de même pour une partie du Zn et du Cd détoxiqué par *G. pulex*.

I.2.1.5 Résumé

En résumé, Zn et Cu sont des métaux essentiels chez *G. pulex* qui en contient naturellement environ 80 $\mu g.g^{-1}$ et 75 $\mu g.g^{-1}$, respectivement. Le Zn est bioaccumulé par *G. pulex* par voie dissoute et détoxiqué à partir d'une concentration d'exposition supérieure à 450 $\mu g.L^{-1}$. En dessous de cette concentration nous ne savons pas si le Zn est régulé ou bien détoxiqué. Le Cd pénètre dans les gammares en provenance de l'alimentation et de l'eau environnante et il est détoxiqué par *G. pulex*.

L'assimilation du Cd par voie trophique est davantage importante que celle des autres métaux (Cu, Zn, Pb) pour de nombreux organismes, y compris pour les gammares marins et pour un isopode d'eau douce. Ceci permet d'émettre l'hypothèse que *G. pulex* accumulerait également le Cd de la nourriture plus efficacement que les autres métaux.

L'importance de la voie dissoute d'entrée d'un métal par rapport à la voie trophique est contrôlée à trois niveaux :

- par les teneurs dans la nourriture et la concentration en métal de l'eau,
- par les conditions physico-chimiques dans l'eau et la qualité (composition chimique et microbiologique) de la nourriture, ce sont là des questions de biodisponibilité, à décliner pour chacune des voies,
- par les capacités biologiques d'absorption des métaux par chacune des voies, c'est la question de dynamique d'absorption par l'organisme à différentes interfaces d'échange.

I.2.2 Modélisation des échanges de métaux entre le gammare et son milieu

Après avoir décrit les processus biologiques qui participent à l'accumulation et à l'excrétion des métaux traces, nous abordons la manière dont ces phénomènes peuvent être mis en équation. De manière générale, la cinétique d'échange de métal entre un organisme et son milieu doit respecter l'équation de conservation de la masse de contaminant qui s'écrit :

Équation 4

$$\frac{d[M]_{org}}{dt} = \mathrm{influx} - \mathrm{efflux}$$

où $[M]_{org}$ est la teneur en métal dans l'organisme en $\mu g.g^{-1}$, *t* est le temps et les flux entrant (influx) et sortant (efflux) sont des flux de métaux en $\mu g.g^{-1}.j^{-1}$, positifs. Plusieurs formalismes existent pour décrire l'influx et l'efflux. Selon Landrum (1998), il en existe trois : celui de la fugacité (i), celui d'échange entre des compartiments (ii), et celui de la biodynamique (iii). Néanmoins, un quatrième type de modèle s'est développé depuis, celui des modèles cinétiques à base énergétique (iv). Dans un premier temps nous justifions pourquoi nous avons choisi le modèle biodynamique parmi ces modèles, et ensuite nous présentons son utilité et ses limites.

I.2.2.1 Choix d'un modèle

La théorie de la fugacité décrit la répartition des contaminants entre le biote et les phases

physiques (eau, sédiment etc.) avec lesquels il est en contact (Mackay et Paterson, 1981). Selon cette théorie, un micropolluant se répartit, à l'équilibre entre les différentes phases d'un système physique, suivant sa tendance à fuir chacune des phases. De même que la pression est la variable intensive décrivant la tendance des molécules à fuir un système gazeux, la fugacité est la variable intensive décrivant la tendance d'une molécule à s'échapper d'une phase (gazeuse ou condensée). Le potentiel chimique d'un contaminant est défini dans chaque phase à partir de sa fugacité. Lorsque différentes phases (l'eau, l'atmosphère, par extension un organisme, etc.) constituent le système d'étude, un état d'équilibre est atteint quand les potentiels chimiques des substances présentes s'égalisent entre les phases, ce qui implique que les fugacités s'égalisent aussi. La fugacité et la concentration d'un contaminant dans une phase à l'équilibre sont liées par la capacité de fugacité, qui s'exprime en $mol.m^{-3}.atm^{-1}$ (Mackay et Paterson, 1981). Ce modèle est le seul à s'exprimer dans le cadre de la thermodynamique et à partir d'une variable (la fugacité) moins approximative en théorie que la concentration en contaminants dans les phases en contact avec l'organisme d'étude. La bioaccumulation des microcontaminants organiques peut être liée à la contamination de l'eau par la théorie de la fugacité, en intégrant si besoin une réaction de dégradation de ce contaminant (Mackay et Fraser, 2000), mais cela est plus difficile et inusité pour les métaux. En effet, la fugacité des métaux sous forme dissoute en phase aqueuse n'est pas mesurable et serait quasiment infinie si elle l'était (du fait d'une pression de vapeur quasi-nulle) (Mackay et Paterson, 1981). Le modèle de la fugacité n'a jamais été utilisé, à notre connaissance pour modéliser les teneurs en Cd, Cu, Zn, Ni ou Ag, et nous l'avons donc écarté du choix d'un modèle pour cette thèse.

Suivant la modélisation par compartiments, la bioaccumulation est décrite comme résultante de flux entrants et sortants d'un ou plusieurs compartiments. Ces compartiments décrivent d'une part l'organisme, et d'autre part l'environnement (Barron et al., 1990; Landrum et al., 1992; Landrum, 1998). Si l'on considère, par exemple, qu'un seul compartiment représente l'organisme et que deux compartiments représentent l'environnement (l'eau et la nourriture), elle formalise l'Équation 4 par l'Équation 5 :

Équation 5

$$\frac{d[M]_{org}}{dt} = k_u.[M] + k_i[M]_f - k_e.[M]_{org}$$

où k_u est le taux d'entrée par voie dissoute ($L.g^{-1}.j^{-1}$), [M] est la concentration en métal dans l'eau ($\mu g.L^{-1}$), k_i est le taux d'entrée par voie trophique ($g.g^{-1}.j^{-1}$), $[M]_f$ la teneur en métal dans la nourriture ($\mu g.g^{-1}$) et k_e est le taux d'élimination (j^{-1}). Nous n'avons pas exclu de choisir un tel modèle, et nous verrons en conclusion pourquoi nous avons préféré le modèle biodynamique.

Le modèle biodynamique prend en compte également deux influx, l'un par la voie dissoute, l'autre par voie trophique, mais il présente deux différences par rapport au modèle par compartiments. Premièrement, il prend en considération la croissance individuelle des organismes, sous forme d'une dilution biologique qui se rapporte formellement à un efflux. Deuxièmement, la constante du premier ordre de l'influx par voie trophique est divisée en deux termes multiplicatifs : le taux d'ingestion de la nourriture et l'efficacité d'assimilation du métal. Il s'exprime ainsi par l'Équation 6 :

Équation 6

$$\frac{d[M]_{org}}{dt} = k_u.[M] + IR.AE.[M]_f - (k_e. + g).[M]_{org}$$

où k_u est le taux d'entrée par voie dissoute (en $L.g^{-1}.j^{-1}$), [M] la concentration en métal dans l'eau (en $\mu g.L^{-1}$), IR est le taux d'ingestion (en $g.g^{-1}.j^{-1}$), AE est l'efficacité d'assimilation (sans unité), $[M]_f$ la teneur en métal dans la nourriture (en $\mu g.g^{-1}$), et k_e est la constante d'excrétion (en j^{-1}), et g la constante de dilution biologique lors de la croissance individuelle (en j^{-1}). Ainsi, la différence entre le modèle biodynamique et un modèle par compartiment est minime, comme le montre le schéma de la Figure 11.

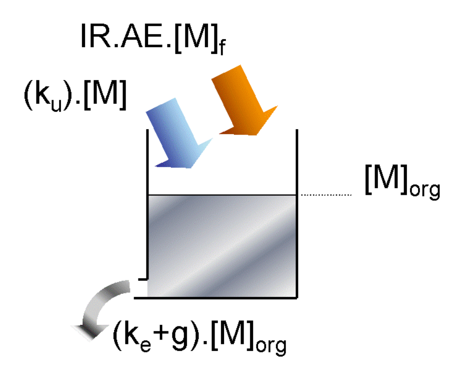


Figure 11 Schéma du modèle biodynamique. Le système biologique modélisé équivaut formellement à un réservoir se remplissant suivant deux entrées et se vidant selon un flux proportionnel au niveau atteint ($[M]_{org}$). $[M]_{org}$ procède d'un équilibre dynamique entre trois termes : son absorption par la voie dissoute, liée à la concentration en métal de l'eau *[M]* via le paramètre k_u, celle par la voie trophique liée à la contamination de la nourriture $[M]_f$ via le taux de nutrition (IR) et l'efficacité d'absorption du métal (AE), et son excrétion (avec k_e, le taux d'excrétion) auquel s'ajoute la dilution biologique lors de la croissance des organismes (g) (Phillips et Rainbow, 1993; Rainbow, 2002; Luoma et Rainbow, 2005).

Enfin, les modèles cinétiques à base énergétique sont de la forme de l'Équation 7 :

Équation 7

$$\frac{d[M]_{org}}{dt} = k_u(t).[M] + k_i(t)[M]_f - k_e(t).[M]_{org}$$

avec les même notations que pour le modèle par compartiments. Les constantes sont, cette fois-ci, variables avec le temps. Ces modèles sont décrits, dans le cas général, par Kooijman et van Haren (1990) et ont été développés en particulier chez *Mytilus galloprovincialis* par Casas (2005). L'expression des constantes du premier ordre en fonction du temps repose sur des considérations concernant le cycle de vie des organismes, leurs besoins en nourriture, leur croissance, leur reproduction et la quantité nutritive du milieu (Casas, 2005). L'inconvénient de ce dernier modèle, par rapport aux deux précédents, est qu'il n'est pas parcimonieux en paramètres. Par exemple, Casas (2005) a inventorié la structure du modèle pour *Mytilus galloprovincialis (*p162 de sa thèse) : il compte treize paramètres. Or, l'objectif principal de ma thèse n'est pas de *développer* un nouveau type de modélisation mais de se servir d'une modélisation (si possible utilisée de manière assez courante) pour interpréter l'influence des facteurs de contrôle de la bioaccumulation.

En conclusion, nous nous sommes donc tournés vers les modèles de types compartiment ou biodynamique. Nous ne faisons référence dans la suite qu'au modèle biodynamique

(sauf en dernière partie dans le cas de la modélisation de la bioaccumulation du Zn) car la modélisation à deux compartiments est un cas particulier de la modélisation biodynamique (celle pour laquelle la dilution biologique est nulle et l'influence du taux de nutrition sur la constante cinétique de l'influx par voie trophique n'est pas considérée).

I.2.2.2 Utilité et validité du modèle biodynamique

Le modèle biodynamique sert à prédire les teneurs en métaux (Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Se et Zn) dans les invertébrés aquatiques autochtones en fonction de deux variables qui caractérisent l'exposition selon les sites : la concentration en métal dissoute et la teneur totale en métal dans la nourriture (Luoma et Rainbow, 2005). Sa validation repose sur la corrélation établie entre les teneurs prédites par le modèle et celles observées dans les organismes autochtones à différents sites, cf. Figure 12 :

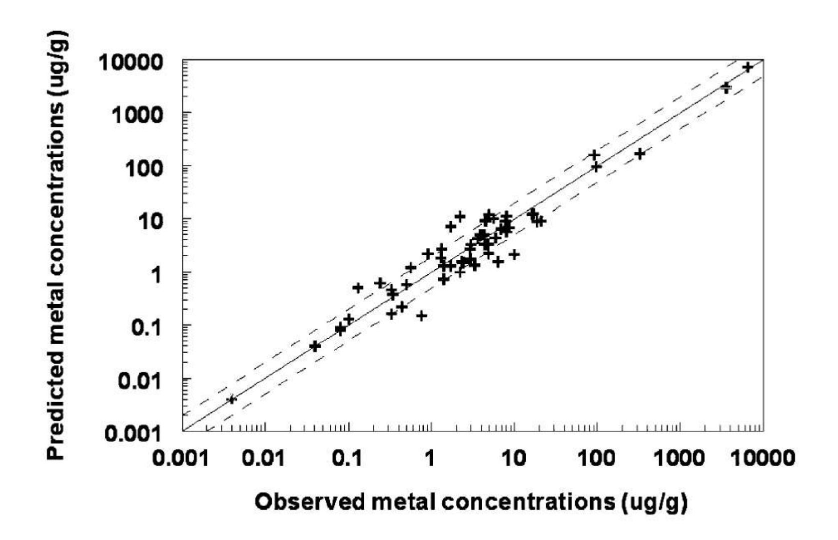


Figure 12 Corrélation entre les teneurs en métaux prédites par le modèle biodynamique (en ordonnées) et celles observées dans les organismes autochtones (en abscisses). Les données portent sur six métaux (Ag, Cd, Cr, Cu, Se et Zn), quatorze espèces et onze écosystèmes différents (il peut y avoir plusieurs sites par écosystème). Les droites en pointillées délimitent la zone couvrant un facteur deux au-dessus et au-dessous de la droite 1:1 (droite noire). Abrrev. $ug.g^{-1}$ est le $\mu g.g^{-1}$. Figure issue de l'article de Luoma et Rainbow (2005).

La prévision du modèle est établie suivant la solution algébrique à l'état stationnaire[7] de l'Équation 6 :

---

[7] Un état stationnaire des teneurs en métal d'une espèce est atteint lorsque ces teneurs n'évoluent pas au cours du temps. L'état stationnaire est une hypothèse théorique nécessaire à cette modélisation.

Équation 8

$$[M]_{org} = \frac{k_u.[M] + IR.AE.[M]_f}{k_e + g}$$

Ainsi, le modèle aide l'interprétation des données de biosurveillance dans deux directions principales :

- il explique les différences importantes que l'on peut rencontrer dans les teneurs bioaccumulées par des organismes de différentes espèces en un même site ; ces différences sont alors expliquées par des cinétiques d'entrée et de sortie différentes (Reinfelder et al., 1997; Lee et al., 1998; Luoma et Rainbow, 2005),
- il permet d'estimer quelle est l'importance de la voie trophique par rapport à celle par voie dissoute pour une espèce et un métal donné, en un site donné (Roditi et Fisher, 1999; Chang et Reinfelder, 2002; Wang et Ke, 2002; Rainbow et al., 2004; Luoma et Rainbow, 2005)

I.2.2.3 Les hypothèses du modèle biodynamique

Le modèle suppose que :

1. Les métaux ne peuvent provenir que de l'eau et de la nourriture.
2. Les deux voies d'entrée des métaux sont additives.
3. Les flux d'entrée par voie dissoute et par voie trophique sont proportionnels à une concentration en métal dans l'eau et à une fraction de métal mesurable de la nourriture, respectivement. Autrement dit, les cinétiques des influx sont du premier ordre en fonction de quantités de métaux mesurables.
4. L'excrétion de métal est proportionnelle à la teneur en contaminant, c'est-à-dire suit aussi une cinétique du premier ordre.
5. Les paramètres k_u, IR, AE, g et k_e sont invariables dans le temps.
6. Les paramètres k_u, AE et k_e ne dépendent que d'un métal donné pour une population donnée (d'une espèce).

Par ailleurs, l'expression particulière du modèle biodynamique selon l'Equation 8 (algébrique) suppose que les teneurs en métaux bioaccumulés dans les organismes n'évoluent pas significativement au cours du temps (état stationnaire). Sans cette dernière hypothèse, le modèle de l'Equation 6 (différentielle) reste valable pour modéliser le lien entre les variations de concentration dans l'eau et dans la nourriture et les teneurs bioaccumulées.

Remarque

En première approximation, les paramètres k_u, AE et k_e valent pour une espèce quelle que soit la population dont les organismes sont issus (par ex. quelque soit la provenance) (Reinfelder et al., 1997; Rainbow et al., 1999; Rainbow, 2002). Cependant, de nombreux travaux montrent l'influence de phénomène d'acclimatation sur ces paramètres (Stephenson et Mackie, 1989b; Stuhlbacher et Maltby, 1992; Bervoets et al., 1995; Buchwalter et Luoma, 2005; Ng et Wang, 2005; Wang et Rainbow, 2005). Ce phénomène est détaillé plus loin au paragraphe « limites du modèle ». Lors de la validation du modèle biodynamique par Luoma et Rainbow (2005), les quatre paramètres sont généralement constants pour chaque espèce ou groupe d'espèces, sauf pour les copépodes où ils sont adaptés à la provenance des organismes.

I.2.2.4 Calibrage des paramètres du modèle biodynamique

Les travaux initiaux de calibrage du modèle biodynamique sur les bivalves marins entre 1996 et 98 ont servi de base à la méthodologie utilisée par la suite pour obtenir les paramètres k_u, AE et k_e à partir d'expérience en laboratoire (Wang et al., 1996a; Reinfelder et al., 1997; Lee et al., 1998). Nous n'examinons dans la suite que le calibrage de ces trois paramètres car :

- il n'est tenu compte de la croissance individuelle que dans le cas où son temps caractéristique (g, en j^{-1}) s'élèverait à hauteur du temps caractéristique d'excrétion du métal étudié (k_e, en j^{-1}) ce qui est rare en pratique du fait que les individus examinés sont choisis dans une classe de taille ne comprenant que des adultes (Fisher et al., 1996; Wang et al., 1996a; Reinfelder et al., 1998; Luoma et Rainbow, 2005),
- le taux d'ingestion est la plupart du temps fixé à partir de travaux antérieurs

d'écologie ou d'écophysiologie des organismes, sauf lors d'expérience de laboratoire visant à déterminer l'efficacité d'assimilation (Reinfelder et al., 1998; Wang et Fisher, 1999).

Calibrage de la voie dissoute et la question de la biodisponibilité

Le taux d'entrée du contaminant par voie dissoute k_u (*uptake clearance rate* ou *uptake rate* en anglais) est le paramètre d'une cinétique du premier ordre. Selon Wang et al. (1996a), il s'obtient à partir des influx initiaux dans les organismes, c'est-à-dire ceux sur une durée initiale de l'expérience d'accumulation durant laquelle la teneur en métal des organismes est influencée le moins possible par le processus d'excrétion. En pratique, des influx initiaux (I_i) de métal sont provoqués par différentes concentrations d'exposition ($[M]_i$), sur une plage couvrant généralement plusieurs ordres de grandeur. Et le paramètre k_u est obtenu comme la constante de proportionnalité reliant les influx aux concentrations, éventuellement en calant une loi non-linéaire de type puissance $I_i = k_u . [M]_i^b$ et en montrant que *b* est proche de 1 (Lee et al., 1998). Certaines variations méthodologiques existent, notamment lorsqu'il n'est pas possible de négliger le phénomène d'excrétion, comme par exemple pour l'accumulation du Cu sur quatre jours dans *Corbicula fluminea* (Croteau et al., 2004).

La concentration en métal dans l'eau doit théoriquement être une concentration en métal biodisponible par voie dissoute (Landrum, 1998). En pratique cependant, la concentration utilisée lors de l'application du modèle au milieu naturel reste actuellement la concentration en métal dissous dans l'eau (Luoma et Rainbow, 2005), de sorte que les calibrages de k_u sont aussi réalisés dans leur grande majorité à partir de concentrations en métaux dissous dans une eau de mer filtrée (Wang et al., 1996a; Lee et al., 1998), ou en utilisant une eau minérale pour les organismes d'eau douce (Tan et Wang, 2008). Le calibrage du k_u à partir d'une concentration définie sur le plan chimique, comme l'activité de l'ion libre dans l'étude de Mylon et al. (2003) sur des algues d'eau douce, pourrait devenir utile à l'avenir, selon Luoma et Rainbow (2005). En conclusion, il est théoriquement reconnu qu'il serait nécessaire de prendre en compte l'effet de la spéciation sur la biodisponibilité des métaux lors des calibrages et de l'application du modèle biodynamique mais cela n'est pas encore fait en pratique.

Mesure de l'efficacité d'assimilation par voie trophique

L'efficacité d'assimilation est définie comme le pourcentage de la teneur en métal de la nourriture qui franchit la barrière intestinale lors de la digestion (Wang et Fisher, 1999). Plusieurs méthodes de mesure de ce paramètre existent, elles ont été détaillées dans la revue bibliographique de Wang et Fisher (1999). La méthode la plus simple consiste à faire le rapport entre la quantité de métal retenue par les organismes après le passage d'un bol alimentaire contaminé et celle dans la nourriture consommée (méthode du "pulse-chase feeding"). Cette méthode a été appliquée aux huîtres marines par exemple, dont les taux d'ingestion étaient connus (ce qui a permis d'émettre une hypothèse fiable en ce qui concerne la quantité de nourriture consommée) et en mesurant directement les quantités de métaux par suivi de traceurs radioactifs de la nourriture (Ke et Wang, 2001).

Cependant, il est de plus en plus difficile et coûteux d'utiliser le suivi de traceurs radioactifs d'une part, et d'autre part, il n'existe pas d'isotope radioactif du cuivre dont la demi-vie soit assez longue pour qu'une quantité de Cu puisse être déduite directement des comptages de radioactivité sur une durée de plusieurs dizaines d'heures (Croteau et al., 2004). C'est pourquoi une autre méthode de mesures de AE a été développée, qui fait appel au traçage des métaux dans la nourriture par des isotopes stables des métaux (Croteau et Luoma, 2007a). Le principe de cette méthode repose toujours sur une technique de "pulse-chase feeding", mais en utilisant un traceur inerte de la digestion (Calow et Fletcher, 1972; Croteau et al., 2004). Le traceur inerte est une substance (on utilise le chrome généralement) qui est très peu (voire pas) assimilable par l'organisme et qui se retrouve intégralement dans les fèces. En comparant les ratios en traceur métallique sur traceur inerte dans la nourriture et dans les fèces, on accède à une mesure de l'efficacité d'assimilation. Cela est aussi possible en réalisant un bilan de masse des traceurs ingérés, internalisés et déféqués. Il a été montré que ces deux méthodes de calcul de AE menaient à une même valeur dans le cas du Cd et du Cu chez *Lymna stagnalis*, un gastéropode d'eau douce (Croteau et al., 2007a).

Calibrage de l'excrétion

Le paramètre k_e est calibré en considérant que c'est la base de temps de la décroissance exponentielle des teneurs en métaux lors de la dépuration des organismes suite à une phase

d'exposition (Lee et al., 1998), cf. Équation 9 :

Équation 9

$$[M]_{org} = [M]_{org}^{O} . e^{-k_e . t}$$

où $[M]_{org}^{O}$ est la teneur en début de phase dépuration. À l'instar du paramètre k_u, k_e est donc la constante cinétique du premier ordre d'un flux *unidirectionnel* de métal (c'est-à-dire que k_u se mesure sur des influx sans efflux et k_e se mesure sur des efflux sans influx). Le temps $\ln(2)/k_e$ est un temps caractéristique du phénomène de bioaccumulation. La phase d'exposition peut avoir impliqué la voie trophique seule, cf. par exemple (Croteau et al., 2008), la voie dissoute seule, cf. par exemple (Tan et Wang, 2008) ou les deux, cf. par exemple (Wang et al., 1996b).

L'utilisation d'une unique constante d'excrétion est une hypothèse trop restrictive par rapport aux données observables lors de la dépuration chez certains couples (métaux, organismes) comme le cuivre chez le bivalve marin *Corbicula fluminea* (Croteau et al., 2004), ou la plupart des métaux dans les moules marines *Mytilus galloprovincialis* (Fisher et al., 1996) et *Mytilus edulis* (Wang et al., 1996a). Il devient alors nécessaire de prendre en compte une modélisation à deux temps caractéristiques de l'excrétion du métal. Wang et al. (1996a) ont émis l'hypothèse que, le processus d'excrétion le plus lent est dominant dans les conditions naturelles, de sorte qu'il ne faille tenir compte que de celui-ci dans les prévisions du modèle biodynamique. Par ailleurs, Fisher et al. (1996) ont montré que seul le temps caractéristique le plus faible se trouvait égal qu'on le mesure en laboratoire ou directement sur le terrain dans des organismes transplantés (de manière générale pour Cd, Cu, Zn et Ni, bien qu'il existe quelques exceptions). Ainsi, l'utilisation d'une unique constante d'excrétion au sein du modèle biodynamique semble justifié, dans la mesure où le but de cette modélisation est de fournir une estimation de la teneur en métaux dans les organismes *en milieu naturel*.

I.2.2.5 Limites du modèle et validité

Nous voyons deux limites principales au modèle biodynamique : l'une repose sur le phénomène de toxicité chez les organismes, qui modifie leur biodynamique, et l'autre

concerne le phénomène d'acclimatation des organismes.

Les limites de détection des méthodes d'analyses chimiques peuvent rendre nécessaire des expositions à des concentrations au-dessus des seuils de toxicité. Or Lotufo et al. (2000) ont observé une baisse des k_u quand les doses d'exposition approchent des doses occasionnant des effets toxiques dans le temps de l'expérience. La linéarité de l'entrée du contaminant avec la concentration d'exposition n'est donc plus valable au-delà d'une limite supérieure liée à l'apparition d'une toxicité chez l'organisme exposé.

En ce qui concerne le phénomène d'adaptation, l'hypothèse de l'unicité du paramètre k_e masque une réalité souvent plus complexe. Il a été montré, par exemple, sur une huître marine que différentes localisations du métal internalisé (dans le cytosol des cellules, ou dans des granules confinés dans des lysosomes, associés aux parois et aux débris cellulaires etc.) impliquaient différentes cinétiques d'excrétion de ce métal (Geffard et al., 2002). De plus, Fowler et al. (1975) ont montré que plusieurs constantes d'excrétion du Zn existaient chez l'amphipode marin *Gammarus locustra* en fonction de la voie d'exposition (dissoute ou trophique) et des conditions d'exposition (concentration d'exposition, durée). Enfin, il a été montré que les chironomes acclimatés à des sédiments contaminés en métaux excrètent le Cd plus rapidement que ceux non-acclimatés (Postma et al., 1996). De façon générale concernant le phénomène d'acclimatation aux métaux par les invertébrés aquatiques, l'article de revue de Wang et Rainbow (2005) souligne que les deux paramètres k_u et k_e peuvent varier suivant l'acquisition de tolérances particulières différentes entre deux populations ou du fait d'une induction de (nouveaux) mécanismes physiologiques de détoxication. L'influence des conditions d'exposition sur la cinétique d'excrétion d'un métal est donc une limite du modèle qui s'étudie au cas par cas et qu'il serait important de caractériser pour les gammares d'eau douce s'ils possèdent la même physiologie que *G. locustra*.

I.2.3 Conclusion

En premier lieu, les gammares sont connus en termes d'écologie, de biologie et de toxicologie, en particulier la bioaccumulation des métaux chez *G. pulex*. En second lieu, cette bioaccumulation peut être décrite suivant des modèles, cette approche permettant

d’en étudier les facteurs de contrôle. Le modèle biodynamique, que nous avons choisi de développer dans cette thèse, décrit la bioaccumulation des métaux pour une espèce donnée (c’est ainsi que nous pouvons parler d’éspèce modèle pour la bioaccumulation des métaux). En vertu des deux avantages scientifiques que nous venons de mentionner, *G. pulex* peut être choisie comme une espèce modèle pour la bioaccumulation des métaux, modèle au sens où l’étude de la bioaccumulation est facilitée pour cette espèce par rapport à d’autres, et où sa réponse biologique vis-à-vis d’excès de métaux dans l’environnement devrait permettre l’utilisation de modèle de bioaccumulation.

I.3 LA SURVEILLANCE DES TENEURS METALLIQUES DANS LES CRUSTACES D'EAU DOUCE

I.3.1 Définitions et contexte scientifique

La surveillance biologique est définie comme l'usage d'organismes vivants dans l'évaluation de changements de systèmes naturels surveillés (Rand et al., 1995). Parmi ces usages, la surveillance des teneurs en métaux dans les crustacés d'eau douce consiste à analyser les tendances observées dans les variations des teneurs métalliques bioaccumulées dans les tissus d'une même espèce à différentes stations en un même temps ou bien à différentes dates à une même station (Phillips et Rainbow, 1993). Ce chapitre aborde ce type de surveillance biologique qui est, par construction, spécifique de la substance ou du groupe de substances analysées. Nous avons centré l'étude sur le suivi des métaux Cd, Cu, Pb et Zn et sur l'utilisation des gammares, hormis certains points particuliers se référant aux études sur les dreissènes (moules d'eau douce) ou les aselles (*Asellus aquaticus*, isopode d'eau douce) cf. Figure 13.



Figure 13 Photos de *Dreissena polymorpha* (à gauche, source : Cemagref, Fréderic Nicolle) et de *Asellus aquaticus* (à droite, source : www.wikipédia.fr)

Préciser l'espèce utilisée importe car il a été montré que les teneurs maximales bioaccumulées, les vitesses d'élimination, ainsi que d'autres modalités de la bioaccumulation variaient sur plusieurs ordres de grandeur selon l'espèce d'invertébré étudiée (Luoma et Rainbow, 2005). Ainsi, on ne compare que des teneurs bioaccumulées par une même espèce. Par surcroît, les teneurs métalliques chez les gammares suivent des lois allométriques, décroissantes en fonction de la taille des individus, comme l'ont montré Rainbow et Moore (1986) pour les métaux Cd, Cu, Zn, Pb et Fe. Ainsi, seuls des teneurs dans des gammares d'une même classe de taille sont comparables.

Les critères qu'une espèce doit respecter afin d'être utilisable pour la surveillance des teneurs métalliques dans le biote sont recensés dans plusieurs revues (Phillips et Rainbow, 1993; Rand, 1995; Forbes et Forbes, 1997). L'espèce doit :

- être présente sur une large étendue géographique, ce qui n'est pas le cas des espèces les plus polluo-sensibles (question de faisabilité du suivi),
- être facile à échantillonner et à transporter (question de coût),
- fournir suffisamment de tissu pour l'analyse et accumuler efficacement les substances (question de sensibilité du moniteur biologique choisi),
- pouvoir être élevée en laboratoire ou au moins utilisée lors d'expérience laboratoire (question de faisabilité de la recherche écotoxicologique).

Selon Phillips et Rainbow (1993), on qualifie d'espèces modèles pour la bioaccumulation des métaux celles pour lesquelles, en plus des critères ci-dessus, on connaît déjà un lien entre la

bioaccumulation et l'exposition. C'est le cas en partie, par exemple, pour le Zn chez *G. pulex* car les cinétiques de bioconcentration et d'élimination du Zn ont été déterminées (Xu et Pascoe, 1993) et que, en se référant à des gammares d'autres milieux, certaines caractéristiques de la bioaccumulation du Zn par voie trophique chez les gammares sont connues (Weeks et Rainbow, 1994; Schlekat et al., 2000).

Le groupe des macro-invertébrés est le plus communément choisi en surveillance biologique des milieux aquatiques (Rand, 1995). Et de nombreux travaux font état de la pertinence du choix des crustacés, en particulier des amphipodes, pour développer un outil de surveillance biologique des métaux traces aquatiques (Plenet, 1995; Amyot et al., 1996; Birge et al., 2000; Clason et Zauke, 2000; Clason et al., 2003; Clason et al., 2004).

Enfin, terminons la présentation du contexte en évoquant les buts poursuivis par les études utilisant la mesure de teneurs métalliques (Cd, Cu, Zn, et Pb) dans les crustacés. Ces buts sont :

1. de faire ressortir des contrastes de biodisponibilité des métaux à différentes stations,
2. de mesurer des variations dans le temps des teneurs pour suivre les conséquences d'un épisode de pollution ainsi que la résilience du biote qui s'ensuit,
3. de valider un modèle de bioaccumulation établi en laboratoire ou sur site.

Les teneurs métalliques dans le biote sont un reflet intégré dans le temps de l'exposition aux métaux du milieu, et les objectifs 1 et 3 visent à préciser les liens entre les données physico-chimiques du milieu et ces teneurs. Certains auteurs mettent en avant le fait qu'aucune technique actuelle ne permet de reproduire en laboratoire les conditions d'exposition de terrain, ne serait-ce qu'au niveau de la spéciation des métaux ou du comportement des organismes, deux phénomènes pouvant contrôler les causes de la bioaccumulation. La mesure des teneurs métalliques peut alors être vue comme une mesure ultime de la biodisponibilité des métaux (toutes voies d'exposition confondues) en conditions naturelles.

Remarque

Il est projeté de suivre les teneurs métalliques dans les crustacés aussi pour des raisons légales, sous l'impulsion de la directive européenne 2008/105/CE (2008), et dans l'optique de préserver un état chimique et écologique des milieux sains.

I.3.2 Les contrastes observés dans les teneurs métalliques

En premier lieu, nous examinons sous quelles conditions (pour quels métaux, où, comment) des contrastes ont été observés entre des teneurs métalliques du biote à différents sites ou dans le temps à un même site. Les travaux revus utilisent la mesure de teneurs métalliques dans des invertébrés autochtones ou bien transplantés par la technique de mise en cage des organismes, cf.Figure 14.



Figure 14 Photo de caisses de transplantation de gammares sur le terrain, contenant chacune six chambres à gammares (Cemagref, Zahra Zemmouchi).

Pour plus de clarté dans la suite de la discussion, nous avons séparé ces observations dans les gammares autochtones et dans ceux transplantés.

I.3.2.1 Gammares autochtones

Fialkowski et al. (2003) ont mesuré les teneurs en Cd, Cu, Pb et Zn de *Gammarus fossarum* dans les rivières Biala et Przemsza (Silésie, Pologne) recevant des effluents miniers et une forte déposition atmosphérique en métaux. Huit stations furent suivies, à quatre dates

successives en 1997-1998. Comparées aux références établies par Rainbow et Moore (1986), les gammares des huit stations se sont avérés contaminés en Zn et en Fe mais pas en Cu, cf. Tableau 2. Les métaux Zn, Cd et Pb présentent des variations temporelles significatives ainsi que des contrastes significatifs entre les sites, ce qui n'est pas généralement le cas pour Fe et Cu. Les auteurs ont supposé que les variations des teneurs en Zn, Cd et Pb traduisent des concentrations biodisponibles, dans l'eau et dans la nourriture, différentes dans le temps et entre les sites, et ont proposé que les teneurs en Fe et Cu chez les gammares ne reflètent pas les variations de la biodisponibilité de ces métaux. Néanmoins, différents facteurs confondants empêchent de conclure sur le lien entre bioaccumulation et biodisponibilité dans cette étude (dont ce n'était pas l'objectif principal). L'influence du contenu digestif des gammares n'a pas été prise en compte par exemple.

Remarque

Le contenu digestif des gammares influence la mesure des teneurs en certains métaux. Amyot et al. (1996) ont montré qu'il contribue beaucoup (à plus de 40% de la teneur totale) aux teneurs en Pb, Mn, Cr, Fe et Ni, mais importe peu (moins de 20% du total) dans la teneur totale en Cd, Cu et Zn.

Lors de l'étude de Plenet (1995), qui a effectué une campagne du même type sur huit stations situées le long d'un gradient d'urbanisation[8], les teneurs en Cu et Zn des gammares ont été constantes chez *G. fossarum,* alors que des variations entre sites étaient mesurées dans les concentrations en Cu et Zn dans les sédiments et les eaux interstitielles. Ceci corrobore, pour le cuivre, la supposition de Fialkowski et al. (2003) en laissant supposer que la capacité de *Gammarus fossarum* à réguler ces métaux s'exerce généralement.

En revanche, la teneur en Cd des gammares pourrait bien refléter les variations de contamination en Cd des milieux aquatiques. Un suivi dans le temps des teneurs en Cd des gammares autochtones dans la Weser (région de Brème, Allemagne), à une station située en aval de rejet d'industrie de sel de potassium, fut effectué par Zauke (1982). Une corrélation

[8] Sur une partie de l'Ain puis du Rhône en amont de l'agglomération Lyonnaise

significative fut établie entre les teneurs métalliques dans les gammares (individus totaux) et les variations de concentration en Cd de l'eau (fraction totale, allant de 0,2 à 2 µg.L^{-1}) ainsi qu'avec les variations de température. Cette étude met également en évidence une légère variation saisonnière des teneurs en Cd des gammares : les teneurs augmentent jusqu'à atteindre [0,55-0,80] µg.g^{-1} en janvier-février alors qu'elles sont dans l'intervalle [0,23-0,40] les mois de juin 1977 et 1978.

Sites les moins contaminés	Cd	Cu	Zn	Pb
Ecosse, Cumbrae Island [1]	nd	77 ± 18	130 + 20	nd
Rivière Becke [2]	[0,08 – 0.5]			
Rivière Werra et Fulda, amont [3]	0,190 ±0.020			
Rivière Ain et Rhône [4]		75 ± 20	65 ± 20	
Salmon's Brook (amont Londres) [5]		42	44	30
Sites les plus contaminés				
Biala & Przemsza confluence [6]	6,0 – 51,0	[41-221]	[37-304]	[42-683]
Rivière Werra et Fulda, aval [3]	0,770 ± 0.20			
Rivière Weser [3]	[0,200-0,800]			
Salmon's Brook (aval RUTP) [5]		100	200	130

Tableau 2. Revue bibliographique des teneurs métalliques (µg.g^{-1}) en Cd, Cu, Zn et Pb mesurées chez des gammares autochtones d'eau douce sur différents sites en Europe. Abréviation : rejet urbain de temps de pluie (RUTP). Les teneurs présentées sont celles de gammares adultes, d'au moins 5 mg de poids sec, de sorte que les études sont comparables entre elles. Références : [1] = (Rainbow et al. 1986), [2] = (Zauke, 1982, repris de Fialkowski et al, 2003) , [3] = (Zauke, 1982) NB : utilisation de l'espèce *Gammarus tigrinus* qui est euryhaline, la salinité de la rivière élevée ayant causé la disparition de *Gammarus pulex* au moment de l'étude, [4] = (Plenet, 1995) , [5] = (Bascombe et al., 1990), [6] = (Fialkowski et al. 2003).

I.3.2.2 Gammares (et autres crustacés)[9] transplantés

Des variations temporelles de bioaccumulation métallique chez un groupe d'aselles adultes transplanté ont été observées par Fraboulet et al. (1992), avant/après un débordement du

[9] Ne disposant que de peu d'études sur l'utilisation de gammares transplantés, nous avons élargi l'étude des contrastes observés dans les crustacés d'eau douce transplantés aux aselles (isopodes) et à la dreissène (moules).

réseau unitaire dans la Seine à Clichy le 7 août 1992 : des augmentations des teneurs en Cd de 0,8 $\mu g.g^{-1}$ à 6,6, en Cu de 194 $\mu g.g^{-1}$ à 411 et en Zn de 113 à 120 $\mu g.g^{-1}$ ont été mesurées à la station de Chatou (sur la Seine). Par contre, cette étude constate une absence de contraste entre les sites en Seine : après quatre semaines d'exposition les teneurs en Cd, Cu, Zn et Pb des aselles en cage ne sont pas significativement différentes aux sites de Chatou et de Suresnes (Fraboulet et al., 1992). Une telle absence de contrastes spatiaux (en Cd, Cu, Zn et Pb dans des *Gammarus pulex*) se retrouve dans l'étude de Rollin et al. (2002) en dépit du fait qu'entre amont et aval des rejets autoroutiers de la région parisienne étudiés, les gradients de concentration en métaux dissous et particulaires étaient élevés. Cependant, pour certains de ces résultats (notamment ceux en Cd et en Pb), des limitations analytiques pourraient expliquer l'absence de contrastes observés dans les teneurs métalliques de cette dernière étude.

En résumé, si les aselles et les gammares en cage permettent de mettre en évidence un épisode de contamination métallique par les RUTP, nous n'avons pas eu connaissance de mise en évidence de contrastes spatiaux de contamination en Cd, Cu, Zn et Pb par cette technique. En revanche, notons qu'une campagne de transplantation de dreissènes en douze stations des cours d'eau des Flandres a mis en évidence des contrastes spatiaux des teneurs en Cd (de 1 à 100), Pb (de 1 à 30), Ni et Al (de 1 à 10) contrairement à celles en Cu, Zn, Mn, As, et Co (Bervoets et al., 2004). Cette étude a validé l'intérêt de la surveillance par bioaccumulation à ces sites et a conduit à un approfondissement en lien avec la concentration en métal dissous dans l'eau, sujet que nous présentons dans un dernier chapitre.

I.3.3 Du lien entre les contrastes observés dans les teneurs métalliques et les variations de la biodisponibilité

Les teneurs en métaux observées dans les gammares *in situ* suivent t'elles les variations de concentration en métal biodisponible dans l'eau et dans la nourriture ? Nous présentons ici dans quelle mesure les causes des variations spatiales et temporelles de teneurs en métaux ont pu être identifiées et quantifiées.

I.3.3.1 La question du lien de cause à effet

M. Bascombe et ses collègues ont mesuré des forts contrastes spatiaux des teneurs en Zn et Pb entre des gammares (*G. pulex*) d'un site propre transplantés à différentes stations autour de Londres. L'exposition des gammares au substrat, pour leur nourriture, et au rejet de métaux dissous a provoqué une bioaccumulation au site le plus contaminé en aval d'un Rejet Urbain par Temps de Pluie (RUTP) reproduites Figure 15. Les cinétiques ont été distinctement mesurées en prenant un point hebdomadaire. Les teneurs en Zn et en Pb se sont stabilisées après environ cinq semaines d'exposition à des teneurs élevés de respectivement 200 $\mu g.g^{-1}$ et de 130 $\mu g.g^{-1}$, contre 50 $\mu g.g^{-1}$ et 30 $\mu g.g^{-1}$ au site de référence. Deux causes ont été évoquées : la présence de particules contaminées en métaux (Pb et Zn) au site aval, probablement consommées par les amphipodes (les gammares entiers avec leur contenu digestif étaient analysés) et le contraste des concentrations en Zn dissous, dont un prélèvement ponctuel montrait qu'elles augmentaient de 120 à 320 $\mu g.L^{-1}$ entre l'amont et l'aval (Bascombe et al., 1990; Shutes et al., 1991; Shutes et al., 1993). Ces études établissent un lien indiscutable entre les variations des teneurs métalliques chez *G. pulex* et des modifications de la contamination des matrices (eau, nourriture), ce a quoi l'on pouvait s'attendre.

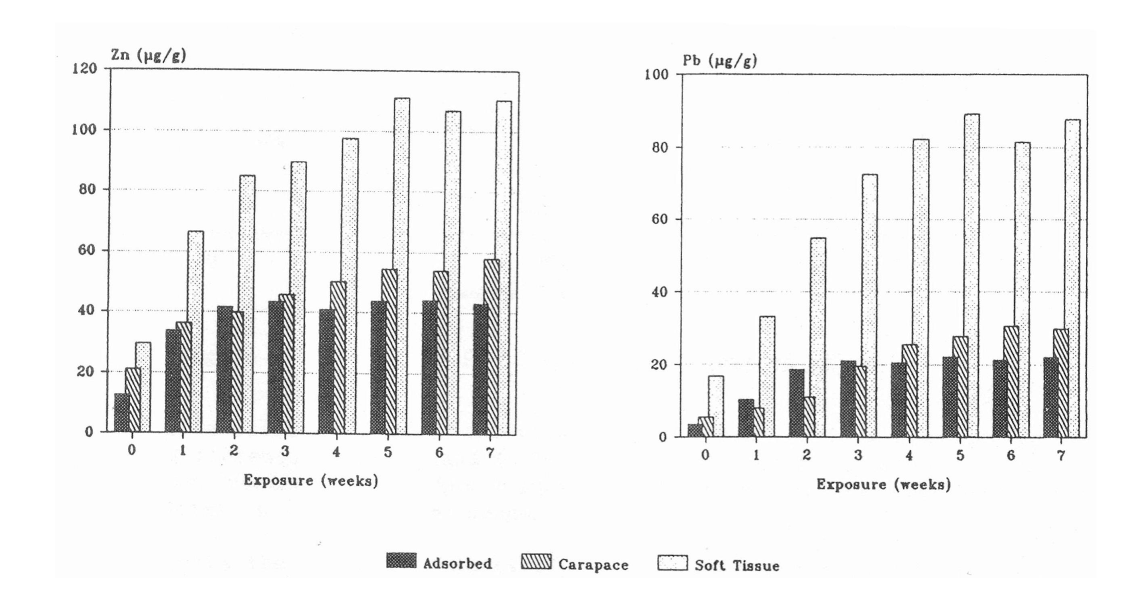


Figure 15. Cinétique de bioaccumulation du Zn et du Pb chez *Gammarus pulex* transplanté d'un site propre à l'aval d'un rejet urbain de temps de pluie (Londres). Figure issue de l'article de Bascombes et al. (1990).

De même, les contrastes entre différents sites de teneurs métalliques ont pu être reliés aux

données chimiques de contamination des matrices (fraction dissoute de l'eau et sédiment) pour Zn et Cd chez des dreissènes transplantées ou autochtones dans le réseau hydrographique belge (Bervoets et al., 2005). Les données de contamination chimique en Cd et Zn ont expliqué respectivement 51% et 75% de la variance observée dans les teneurs des moules, et celles pour les autres métaux étudiés (dont Cu, Ni et Pb) n'ont pas expliqué significativement les teneurs observées. Une relation de corrélation ne prouve pas de lien de cause à effet en général, mais dans le cas présent, ce lien avait été fait au préalable en laboratoire au cours du développement d'un modèle biodynamique (Roditi et Fisher, 1999).

En conclusion, les campagnes de transplantation d'organismes en cage prouvent que les variations des concentrations en Cd et en Zn dans la nourriture et dans l'eau sont des causes des variations des teneurs en Cd et Zn observées dans les gammares et les moules d'eau douce. Au-delà des corrélations, l'établissement d'un lien quantitatif entre des données chimiques de contamination des matrices du milieu et la bioaccumulation nécessite l'utilisation de modèles de bioaccumulation.

I.3.3.2 Validation de modèle d'accumulation des métaux chez des invertébrés aquatiques

Faisabilité de la modélisation de la bioconcentration

En utilisant la concentration en métal total de l'eau comme prédicteur de la bioaccumulation des métaux, des modèles à compartiments ont été proposés chez des collectifs (regroupant parfois plusieurs espèces) de gammares estuariens et marins (Ritterhoff et al., 1996; Clason et Zauke, 2000; Clason et al., 2004). Ces gammares ont été exposés à des concentrations entre dix et cent fois supérieures à celles naturellement présentes dans l'eau utilisée, dans un module d'exposition placé à coté des sites de terrain ou lors d'expositions en laboratoire utilisant de l'eau du terrain. Ces études montrent que les modèles à compartiments (Ritterhoff et al., 1996; Clason et Zauke, 2000; Clason et al., 2004), et hyperbolique (Clason et al., 2003), fournissent des paramètres cinétiques décrivant la bioaccumulation des métaux par voie dissoute (Cd, Cu, Ni, Pb), sauf exception (Cr, Hg, et Zn selon les espèces de gammares marins étudiés). Il a été montré que ces paramètres modélisaient convenablement des toxicocinétiques indépendantes provoquées en d'autres sites (Ritterhoff et al., 1996) ou à d'autres concentrations des métaux totaux dans l'eau (Clason et

al., 2003). Par ailleurs, la prévision à l'équilibre, en terme de facteur de bioconcentration (BCF), issue des modèles à deux compartiments, a été du même ordre de grandeur que la valeur mesurée *in situ*, dans des gammares autochtones (Zauke et al., 1995). En conclusion, la faisabilité de la modélisation toxicocinétique a été montrée chez les gammares estuariens, en mettant en perspective la pertinence d'une prévision de la bioaccumulation chez les gammares autochtones, à l'équilibre, issue des modèles à deux compartiments.

Démonstration de l'importance générale de la bioaccumulation par voie trophique pour le Cd et le Se en utilisant le modèle biodynamique

Luoma et Rainbow (2005) ont passé en revue douze études (dont quatre concernent des organismes autochtones d'eau douce) pour lesquelles des prévisions de teneurs en métaux étaient réalisées à l'aide d'un modèle biodynamique incluant presque[10] tous la voie trophique d'accumulation. Ils montrent que le modèle s'adapte à toutes les espèces étudiées et à la plupart des métaux (dont Cd, Se, Cu, Zn). Et les comparaisons entre valeurs prédites et observées prouvent l'importance de la voie trophique pour les métaux, dont le Cd et le Se, cf. Figure 16.

[10] Exception faite des modèles adaptés aux gammares (estuariens ou marins).

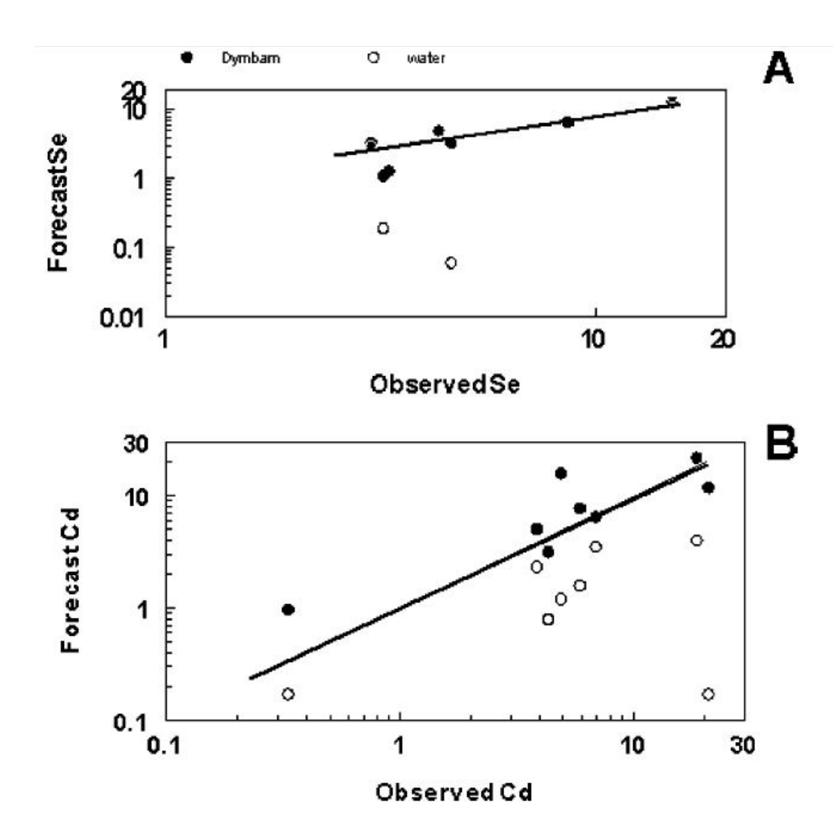


Figure 16. Comparaison de la performance de la prévision du modèle biodynamique en prenant en compte (●) ou non (O) la voie trophique pour le Se (A) et le Cd (B). Figure issue de Luoma et Rainbow (2005).

I.3.3.3 Complément sur l'acclimatation et adaptation des organismes

L'interprétation des causes des variations des teneurs en métaux dans les gammares autochtones est plus complexe que celle sur des populations homogènes (transplantées) à cause des phénomènes d'acclimatation (génétique ou phénotypique) et d'adaptation (génétique). Stuhlbacher et Maltby (1992) n'ont pas observé de différence significative entre les bioaccumulations en Cd de groupes de *Gammarus pulex* préalablement exposés à différentes concentrations en Cd dissous. Par contre, les localisations du Cd bioaccumulé étaient différentes selon les groupes, ceux ayant été pré-exposés à 10 et 20 $\mu g.L^{-1}$ de Cd comportant davantage de Cd accumulé dans leur hépatopancréas, où il fut vérifié que des sécrétions de métallothionéines avaient été induites (Stuhlbacher et Maltby, 1992). De plus des résultats préliminaires indiquent qu'une adaptation de *G. pulex* à la toxicité du Cd d'origine génétique existe et qu'elle n'est pas héritable (Chaumot, 2008). Deux études apportent des preuves que les mécanismes de séquestration et de détoxication des métaux et d'élimination sont inductibles génétiquement chez l'huître et chez le gammare (Geffard et al., 2002; Geffard et al., 2007). Il existe donc une acclimatation des gammares à l'exposition

au Cd (au moins par voie dissoute). En conséquence, une biodisponibilité en Cd dans l'eau similaire à deux endroits différents pourrait tout de même causer des teneurs différentes en Cd chez des groupes d'individus (ou population) n'ayant pas vu les mêmes contaminations par le passé. C'est là une limite importante des comparaisons entre teneur bioaccumulées chez des gammares autochtones pris à différents sites. D'autres aspects de ce phénomène, notamment les adaptations croisées entre les métaux ont été détaillés par Wang et Rainbow (Wang et Rainbow, 2005) pour les invertébrés marins.

Enfin, d'autres adaptations des gammares sont possible face à une contamination : il a été montré, par exemple, que *Gammarus pulex* changeait de substrat et même de bief du cours d'eau en fonction des épisodes de pollution dans une rivière exposée aux pesticides (Schulz et Liess, 1999). Comme, de plus, des comportements d'évitements de sédiments contaminés en cuivre ont été constatés en laboratoire dans l'étude de Taylor et al. (1994), on peut supposer qu'il existe des adaptations comportementales des gammares à différentes sortes de contamination en métaux traces (de l'eau, de la nourriture, du sédiment).

I.3.4 Conclusions

Sans caractère systématique, des contrastes temporels de bioaccumulation en Cd ont donc été mis en évidence chez les gammares autochtones d'eau douce, ainsi que des contrastes spatiaux et temporels de contamination en Pb, Ni en Zn. Les teneurs en certains métaux varient donc moins (Pb) voire très rarement (Cu, Fe) dans l'espace et le temps, que d'autres (Zn, Cd et Ni[11]) chez cet organisme. Dans la plupart des études mettant en évidence de tels contrastes, les causes de ces variations n'ont pas été recherchées. Cependant, en vertu du choix des sites, on peut penser que les variations de la biodisponibilité des métaux expliquent en partie au moins ces variations.

La technique de transplantation d'organisme en cage est faisable avec des dreissènes, des gammares ou des aselles. Le Cu et le Fe sont régulés par les gammares d'eau douce sur une plage de concentration comprenant les concentrations environnementales (eau et

[11] Pour le Ni, cette conclusion repose sur des études évoquées dans la suite du chapitre

nourriture) de la plupart des sites étudiés dans les études revues. Les capacités de régulation des gammares en Cu n'ont été dépassées que lorsque la période de transplantation couvrait un pic de pollution notable, de type RUTP. En revanche des contrastes importants observés avec le Cd, Ni et, dans une moindre mesure le Pb, montrent l'intérêt de mesurer les teneurs en ces métaux dans les gammares transplantés. Enfin, le modèle dont la performance est la mieux établie pour prévoir les teneurs à l'état stationnaire en métaux dans les invertébrés autochtones est le modèle biodynamique. La confrontation des prévisions de ce modèle aux observations montrent qu'il importe de prendre en compte la voie trophique de bioaccumulation en général, et en particulier dans le cas du Cd.

I.4 OBJECTIFS ET PROBLEMATIQUE DE LA THESE

I.4.1 Objectifs

L'objectif général de la thèse est d'explorer les facteurs de contrôle de la bioaccumulation chez *G. pulex* afin de développer un outil (un système biologique) qui puisse rendre compte d'éventuelles modifications de biodisponibilité des microcontaminants.

1. D'un point de vue cinétique, un surcroît de bioaccumulation résulte d'influx du contaminant, par voie dissoute ou trophique, excédants le(s) flux d'élimination. Les gammares ont un spectre trophique large, or les matrices solides en rivière contiennent une partie importante des métaux des milieux aquatiques. La biodisponibilité de ces métaux pour les invertébrés filtreurs et décomposeurs reste méconnue, alors même que la voie trophique de bioaccumulation importe généralement, au moins pour le Cd.

→ Un premier objectif de cette thèse a donc été de caractériser la voie dissoute de contamination. Nous avons choisi d'étudier les toxicocinétiques des contaminants sélectionnés (Cd et B[a]P) en conditions de laboratoire contrôlées (en milieu minéral), afin d'établir des paramètres de modèles biodynamiques pour ces substances.

→ Un second objectif a été d'évaluer l'importance de la voie trophique, de quantifier l'influx trophique de métaux et d'en déterminer l'importance par rapport à la voie dissoute.

2. La présence de ligands organiques influence la biodisponibilité des métaux par voie dissoute, nous devons donc en tenir compte.

→ De manière opérationnelle, nous avons choisi de répondre à la question : comment prendre en compte l'effet de la spéciation du Cd sur sa biodisponibilité chez *G. pulex* en présence de ligands organiques ? La mesure de la labilité des métaux par la technique de la DGT fut choisie comme outil d'estimation de la spéciation et comme lien méthodologique entre les différents milieux aquatiques mis en jeu.

3. La voie dissoute de contamination du Cd chez les crustacés est soumise à certains facteurs de contrôle physico-chimiques. Ceux ayant été identifié comme prioritaires sont : la température, la concentration en calcium et la multi-contamination métallique. Faut-il en tenir compte pour modéliser la bioaccumulation du Cd chez *G. pulex* ?

→ Un troisième objectif de cette thèse a donc été de quantifier dans quelle mesure ces facteurs influencent les cinétiques d'accumulation du Cd chez *G. pulex*, afin de choisir le(s) facteur(s) le(s) plus pertinent(s) en vue de modéliser la bioaccumulation.

4. Enfin, établir de tels liens entre la biodisponibilité des microcontaminants dans différentes matrices et leur bioaccumulation dans un organisme modèle constitue l'étape préalable au développement d'un outil de biosurveillance. Nous avons vu que les métaux (Cd, Zn, Cu, Pb) étaient présents dans les cours d'eau d'Ile de France à faibles doses et de manière chronique. Cependant, des épisodes de contamination en métaux plus forts se produisent en période d'étiage, causés généralement par les RUTP, et pouvant contaminer les gammares.

→ Sait-on expliquer les teneurs en métaux dans les gammares en utilisant des informations de nature physico-chimique ? Les études de laboratoire devraient permettre d'obtenir les résultats (paramètres) et conclusions suffisantes en vue de modéliser la biodynamique du Cd et du B[a]P chez le gammare *G. pulex in situ*, dernier objectif de cette thèse.

I.4.2 Démarche

Pour répondre à ces questions, nous avons opté pour une méthodologie fondée sur des expériences de laboratoire dont les résultats seront mis à profit, via l'utilisation d'un modèle

de bioaccumulation, pour analyser des données de biosurveillance.

Nous avons donc d'abord précisé comment les contaminants dissous sont accumulés chez *G. pulex* en calibrant les cinétiques de bioaccumulation du Cd et du B[a]P en milieu minéral, puis en étudiant ces mêmes cinétiques en présence de ligands organiques. En second lieu, nous avons adapté la méthodologie existante de caractérisation de la voie trophique au cas du Cd et du Cu chez *G. pulex.* Enfin, en matière d'étude de terrain, nous avons d'abord examiné la méthodologie du prélèvement des gammares et de l'analyse de leurs teneurs en métaux et de la faisabilité des transplantations. Puis nous avons mesuré les teneurs en métaux dans les gammares autochtones en contexte de "petits cours d'eau urbains" dans le bassin Seine-Normandie dans le but d'évaluer la pertinence du modèle biodynamique développé lors de cette thèse.

II. ETUDES TOXICOCINETIQUES DU CADMIUM ET DU BENZO[A]PYRENE DISSOUS CHEZ *G. PULEX*

Les gammares sont en contact permanent avec l'eau, cela s'impose en particulier du fait de leur respiration. Ainsi, la plupart des microcontaminants sont bioaccumulés par contact avec l'eau, et ceci de façon indépendante de l'apport par la nourriture. Nous appelons ce phénomène la voie dissoute de bioaccumulation. Il possède deux déterminants : les caractéristiques physico-chimiques de l'eau et les caractéristiques biologiques de l'organisme étudié. Du côté du milieu aquatique, la composition physico-chimique de l'eau détermine la biodisponibilité des microcontaminants. Nous avons vu, en particulier, que la matière organique dissoute joue un rôle majeur en matière de complexation des métaux pouvant mener, pour certains organismes aquatiques, à une réduction de la biodisponibilité par voie dissoute. Du côté de l'organisme d'étude, les processus biologiques par lesquels pénètrent les contaminants, et ceux permettant leur élimination, déterminent quelle vont être l'ampleur et les caractéristiques cinétiques de la bioaccumulation.

Nous avons choisi *G. pulex* comme espèce modèle, le Cd et le B[a]P comme contaminants d'étude, et le modèle biodynamique comme cadre d'interprétation des déterminants que nous venons d'évoquer. Les deux premiers chapitres de cette partie traitent d’expériences sur l’accumulation par voie dissoute du Cd et le dernier traite de celle du B[a]P ; avec un paragraphe introductif justifiant le choix de ce microcontaminant organique et présentant un bref état des connaissances (détaché de la partie précédente afin de facilier sa mise en relation avec les expériences sur le B[a]P).

Les deux paramètres de ce modèle permettant de prendre en compte la spécificité l'organisme d'étude, vis-à-vis de la bioaccumulation du Cd et du B[a]P, étaient cependant inconnus pour *G. pulex*. Ces deux paramètres sont le taux d'entrée par voie dissoute et la constante de dépuration. Il a donc fallu dans un premier temps les déterminer. Rien n'empêche, *a priori*, que le modèle biodynamique puisse représenter de manière pertinente la bioaccumulation du B[a]P. C'est la raison pour laquelle nous avons appliqué la même détermination pour ce contaminant organique. Ce calibrage a été conçu comme une première étape ouvrant sur la possibilité d'étudier les questions de biodisponibilité

sous différentes conditions physico-chimiques : par ajouts de ligands organiques, modification de la température ou de la concentration en calcium dissous.

Nous avons choisi d'étudier l'influence de ces conditions physico-chimiques après classement des facteurs physico-chimiques connus pour influencer le plus l'accumulation des métaux dans le gammare. D'une part nous rappelons qu'il existe de fortes présomptions que les mêmes voies biochimiques de pénétration dans les crustacés aquatiques soient empruntées par le cadmium et le calcium. Et l'effet inhibiteur du calcium sur la bioaccumulation du Cd a été démontré de manière indiscutable, concernant la bioaccumulation à l'équilibre chez l'amphipode d'eau douce *Hyalella azteca* (Stephenson et Mackie, 1989a) par exemple, ou dans un cadre cinétique pour un autre crustacé, la daphnie (Penttinen et al., 1995). Parmi les autres facteurs de contrôle mis en évidence (Zn, pH, T, force ionique), nous avons sélectionné la température sur la base des résultats préliminaires de Stephenson et Mackie (1989a) qui montrent que le pH aurait peu d'influence sur la bioaccumulation du Cd et en ciblant le paramètre susceptible de varier *'le plus'* sur le terrain (et de varier systématiquement, contrairement à la concentration calcique ou à celle en zinc).

Nos objectifs ont été :

- de déterminer les paramètres du modèle biodynamique de la bioaccumulation par voie dissoute du Cd et du B[a]P chez *G. pulex,*
- d'étudier l'influence de la spéciation du Cd en présence de ligands organiques sur sa biodisponibilité,
- de déterminer comment prendre en compte, s'il le faut et dans le cadre du modèle biodynamique, l'influence de facteurs de contrôles physico-chimiques potentiels de la biodisponibilité du Cd ([Ca] et T).

Ajoutons à ces objectifs que, dans le cadre de notre étude de l'influence des ligands organiques sur la biodisponibilité du Cd chez *G. pulex*, nous avons souhaité estimer l'intérêt de la mesure du métal labile pour déterminer la biodisponibilité du Cd, cf. Figure

17.



Figure 17 Utilisation de la DGT (Diffusive Gradients in Thin-films) lors d'expérience de bioaccumulation du Cd chez *G. pulex* en laboratoire. Le dispositif de renouvellement continu de l'eau contaminée permet de maintenir des concentrations constantes dans les traitements malgré l'accumulation de Cd dans la DGT et dans les gammares.

II.1 TOXICO-CINETIQUE DU CD EN MILIEU MINERAL, AVEC OU SANS LIGANDS ORGANIQUES

II.1.1 Synthèse de la méthode

II.1.1.1 Système expérimental

Des gammares *G. pulex* adultes de taille 11,52 ± 1,7 mm ont été collectés en site non-contaminé (La Bourbre à L'Isle d'Abeau, dont les caractéristiques sont détaillées dans une publication : (Geffard et al., 2007)). Ils ont été exposés à des concentrations nominales en Cd de 0 (contrôle)- 0,2- 1- 3 et 9 $\mu g.L^{-1}$ dans le système d'exposition présenté Figure 18.

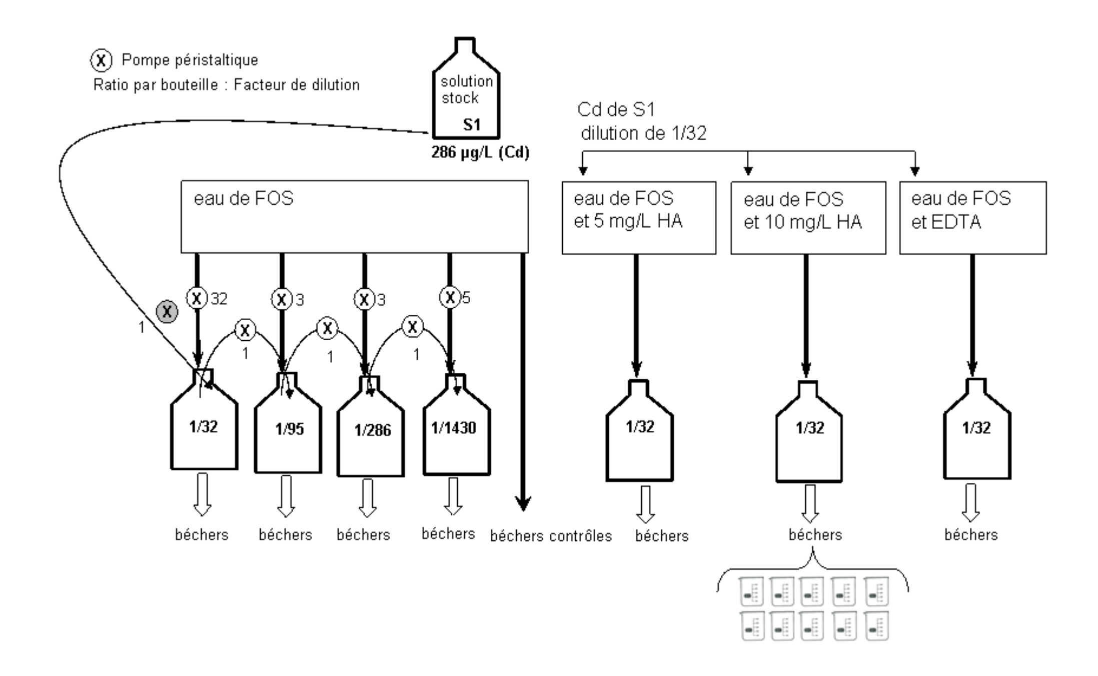


Figure 18 Schéma du système de distribution continue d'eau : exposition des gammares au Cd en eau minérale à gauche, et avec ajouts de ligands organiques à droite. Un système de goutte à goutte renouvelait en permanence l'eau des dix béchers utilisés pour chaque traitement.

L'eau minérale utilisée (appelée eau de FOS Figure 18) était tirée d'un forage sur le site du Cemagref de Lyon, et contenait très peu de matière particulaire *a priori*. Durant une première phase d'exposition des gammares au Cd, le système alimente les béchers en permanence de solution stock contaminée en Cd diluée dans l'eau minérale par un système de pompes péristaltiques. Durant une seconde phase, de dépuration des métaux par les gammares, le système alimente les béchers en eau minérale directement.

A cette partie de l'expérience, nous avons ajouté trois conditions d'exposition nommées EDTA, HA5 et HA10 où respectivement 10 $\mu g.L^{-1}$ d'EDTA (acide éthylène-diamine-tétra acétique) et 5 et 10 $mg.L^{-1}$ d'acides humiques Aldrich ont été ajoutés à de l'eau contaminée à 9 $\mu g.L^{-1}$ de Cd. Les solutions de Cd et de ligands ont été préparé 24 h à l'avance afin d'assurer l'équilibre chimique en solution, comme dans l'étude de Koukal, Guéguen et al. (2003).

Les gammares ont été soumis à une phase d'exposition en eau minérale contaminée en Cd de 7 jours puis à une phase de dépuration de 14 jours durant laquelle ils ont été nourris avec des feuilles d'aulnes non contaminées en Cd (0,05 $\mu g.g^{-1}$, données non publiées). Les gammares ont été échantillonnés aux temps : *t*= 0- 0,25- 0.5- 1- 1,5- 2- 3- 4- 5- 6 et 7 jours, pendant la phase d'accumulation pour les 7 expériences, et, pour les expériences en eau

minérale seulement, à t= 0,5- 1- 2- 3- 4- 6- 8- 10- 12 et 14 jours, en phase de dépuration.

La concentration en Cd total a été mesurée quotidiennement durant l'exposition dans tous les milieux et à trois reprises au cours de la dépuration. Les prélèvements d'eau brute acidifiés à pH2 par ajouts d'acide nitrique ultrapur ont été analysés par spectrométrie d'absorption atomique four à correction Zeeman (AAS). Nous avons supposé que cette concentration fut égale à la concentration en métal dissous lors des expériences en eau minérale. De plus, trois DGT munis de gels de diffusion restrictifs ont été exposés durant 1, 2 et 6 j dans chacun des cinq traitements afin de mesurer la concentration en Cd labile durant l'exposition. Les gels restrictifs permettent la diffusion des ions métalliques libres et limitent celle des complexes des métaux formés avec les substances humiques (Zhang et Davison, 2000). Les résines chélatantes des DGT ont été éluées dans 5 mL de solution de 1M-HNO_3, les éluats ayant été ensuite analysés par AAS. La concentration en Cd labile, notée $[Cd]_{DGT}$ et exprimée en $\mu g.L^{-1}$, a été calculée suivant l'Équation 10 :

Équation 10

$$[Cd]_{DGT} = \frac{p.V.\Delta g}{D.A.10^5}$$

où p est la pente de la régression linéaire de la concentration en Cd des éluats de DGT en fonction du temps d'exposition ($\mu g.L^{-1}.s^{-1}$), V est le volume d'élution (mL), Δg est l'épaisseur de la couche de diffusion (mm), D est le coefficient de diffusion du Cd dans le gel (à 12,3 °C : $3{,}49.10^{-6}$ $cm^2.s^{-1}$), et A est l'aire de la fenêtre d'ouverture de la DGT (cm²). L'épaisseur de la couche de diffusion étant inconnue dans les conditions d'agitation de l'eau de notre expérience (faible agitation), nous avons calibré Δg en utilisant un traitement (celui à 1 $\mu g.L^{-1}$) pour lequel la concentration labile a été supposée égale à la concentration en Cd de l'eau brute, comme le propose Ferreira et al. (2008). Ainsi, nous avons utilisé Δg = 1,30 mm, soit une couche limite de diffusion de 0,38 mm en plus de l'épaisseur du gel de diffusion (0,97 mm). Les gammares ont été prélevés par groupe de cinq, en triplicats, lyophilisés, pesés puis soumis à une minéralisation acide par ajout de 50 µL de HNO_3 ultra-pur par mg de gammares poids sec, puis le jour suivant ajout de 20 µL de H_2O_2 ultra-pur par mg de gammare, et enfin, 6 jours après, une dilution de 430 µL d'eau ultra-pure par mg de gammare. Les minéralisats

ont été analysés par AAS.

II.1.1.2 Exploitation des données

Les cinétiques des teneurs en Cd accumulées par les gammares $[Cd]_{org}$ ont été interprétées suivant le modèle de l'Équation 11 :

Équation 11

$$\frac{d[Cd]_{org}}{dt} = k_u.[Cd] - (k_{dep} + g).[Cd]_{org}$$

où *t* est le temps (j), k_u est le taux d'entrée par voie dissoute ($L.g^{-1}.j^{-1}$), *[Cd]* est la concentration biodisponible en Cd dans l'eau en $\mu g.L^{-1}$, k_{dep} est le taux d'élimination (j^{-1}) et g la constante de dilution biologique (j^{-1}). On détermine un seul couple de paramètres k_u et k_{dep} pour l'ensemble de concentrations testées en milieu minéral. De plus, nous avons choisi de comparer deux méthodes de détermination de k_u et k_{dep} : d'une part la méthode du DYM-BAM (DYnamic Multi-pathway BioAccumulation Model), qui est celle préconisée par Luoma et Rainbow (2005), et dont on peut trouver les fondements méthodologiques dans l'établissement du modèle biodynamique de bioaccumulation des métaux chez la moule marine de Wang et al. (1996a), et d'autre part une méthode globale d'interprétation des constantes toxicocinétiques. Par méthode globale, nous entendons une régression non-linéaire de la fonction continue par morceau, solution de l'Équation 11, respectant les conditions initiales au début de l'accumulation et en début de dépuration, comme proposé par Ritterhoff et al. (1996). Cette solution est de la forme :

$$\begin{cases} pour\ t < 7 \quad [Cd]_{org} = \dfrac{k'_u}{k'_{dep}+g'}.[Cd]_b.(1-\exp(-(k'_{dep}+g').t)) \\ pour\ t > 7 \quad [Cd]_{org} = [Cd]_{org(t=7)}.\exp(-(k'_{dep}+g').t) \end{cases}$$

Nous avons essayé, sans succès, de faire converger par la méthode du gradient un ajustement non-linéaire de cette fonction à l'ensemble des données en utilisant la routine "nls" du logiciel *[R]* (R Development Core Team, 2008). Le problème de convergence pourrait être lié au fait que la fonction ainsi définie soit continue par morceaux sur l'intervalle d'étude mais non dérivable. Ce type de fonction n'est pas implémentable dans le module

XLSTAT version 2009 (Addinsoft SARL, France). Le solveur d'Excel a donc été utilisé pour ajuster les paramètres de ce modèle aux données, qui ont été nommées k'_u, k'_{dep} (et g').

La méthode DYM-BAM repose sur l'hypothèse qu'il existe une durée initiale (courte) durant laquelle la contribution du terme d'élimination dans l'Équation 11 est négligeable. En effet, le taux d'entrée par voie dissoute est aussi la constante de proportionnalité entre l’influx initial de Cd (dérivée temporelle des teneurs en Cd fonction du temps) et la concentration $[Cd]_b$. k_u a donc été calculé comme la pente des influx initiaux de Cd en fonction de la concentration en Cd. *A posteriori* à *t*=2 j, il a été vérifié que la contribution du terme d'élimination était inférieure en valeur absolue à 15% de celle du terme d'accumulation. k_u a été déterminé en utilisant les données d'accumulation lors des deux premiers jours et k_{dep} a été déterminé sur les données de dépuration. Le k_{dep} est calculé sur la base des pentes de régression log-linéaire des décroissances des teneurs en Cd lors de la dépuration, diminué d'un terme de biodilution. Les deux constantes nommées k_u et k_{dep} ont donc été déterminées sur deux sous-jeux (distincts) des données. Le logiciel *[R]* a été utilisé pour calculer les modèles linéaires menant aux influx initiaux de Cd, puis au taux d'entrée par voie dissoute, ainsi que pour les régressions log-linéaires, et les tests statistiques associés.

II.1.2 Résultats et discussion

II.1.2.1 Concentrations en Cd dans l'eau et dans le gammare

Les concentrations en Cd total dans l'eau sont indiquées Figure 19, et dans l'eau du contrôle la concentration en Cd est inférieure à la LD de 0,03 $\mu g.L^{-1}$. La concentration en Cd labile du milieu contrôle n'est pas déterminable car les éluats des résines chélatantes contiennent autant de Cd qu'une résine n'ayant pas été exposée (1,5 ng de Cd par résine). Dans les autres traitements, les concentrations en Cd labile sont égales aux concentrations dans l'eau brute (moins de 4% de différence) sauf à la plus faible exposition où il y a un écart de 16%, cf. Figure 19. Les concentrations en Cd total ont été stables au cours du temps durant la phase d'exposition et les accumulations dans les DGT présentent des linéarités satisfaisantes ($r^2 > 0.97$) sauf à 0,2 $\mu g.L^{-1}$ où la linéarité est faible ($r^2 = 0,47$).

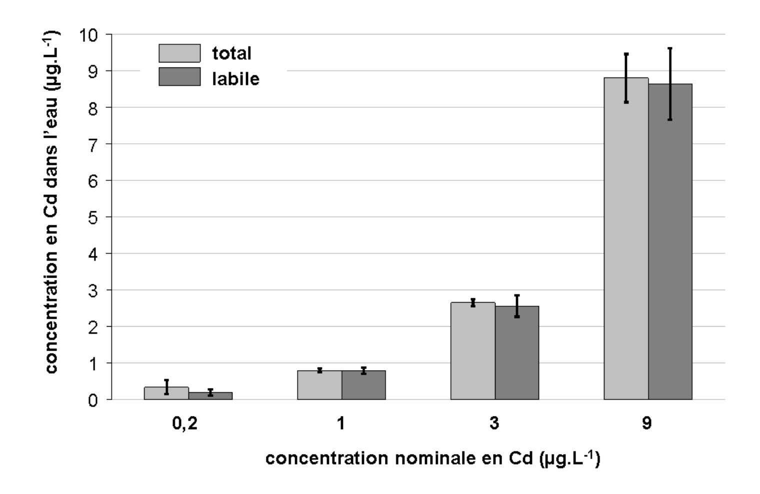


Figure 19 Concentration d'exposition en Cd total et labile ($\mu g.L^{-1}$) dans les traitements en eau minérale pour la phase d'accumulation des toxicocinétiques du Cd. Moyenne ± E-T (*n*=7).

Les teneurs en Cd accumulées puis éliminées par les gammares au cours des expériences sont présentées (Figure 20). Sauf pour le traitement 0,2 $\mu g.L^{-1}$, les teneurs en Cd ont augmenté avec le temps, de façon linéaire au moins au cours des deux premiers jours d'accumulation, puis les teneurs ont décru de façon lente au cours de la phase de dépuration. L'exposition à la plus basse concentration en Cd (0,2 $\mu g.L^{-1}$) a provoqué une augmentation faible des teneurs en Cd, puis la teneur atteinte n'a pas décru significativement durant la phase de dépuration. Pour cette raison, le traitement 0,2 $\mu g.L^{-1}$ de Cd a été écarté de la modélisation ultérieure.

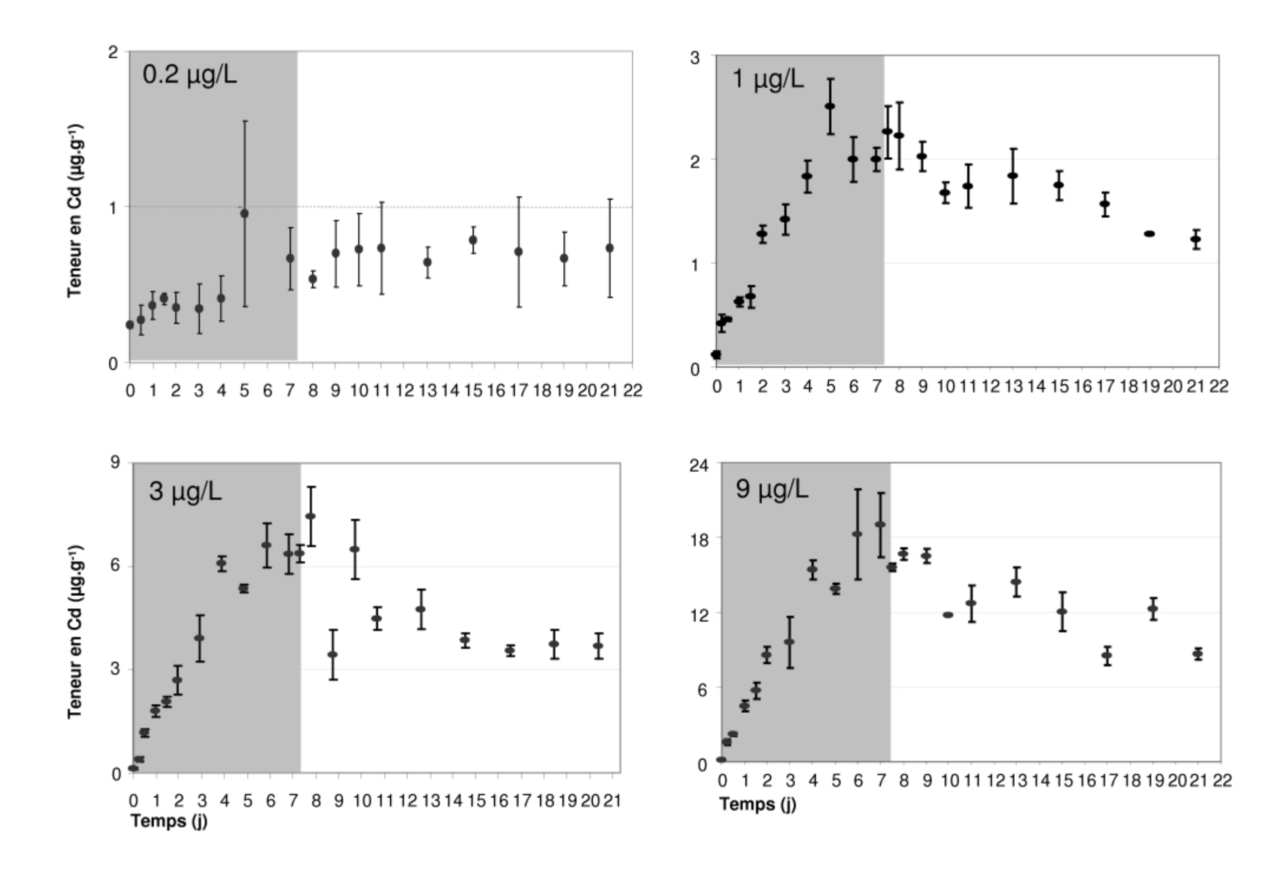


Figure 20. Toxicocinétiques du Cd chez *G. pulex*, en milieu minéral, pour les concentrations (nominales) d'exposition de 0,2, 1, 3 et 9 µg.L^{-1}.

II.1.2.2 Comparaison des méthodes d'interprétation des toxico-cinétiques

L'ajustement aux données, par la méthode globale, mène aux paramètres moyens (*n*=3) : k'_u = 0,51 L.g^{-1}.j^{-1} et k'_{dep} = 0,070 j^{-1}, en tenant compte d'une biodilution de 0,003 j^{-1} pour le calcul de k'_{dep} (calculée sur l'évolution des poids des gammares sur 21 jours). On constate sur la Figure 21 que les prévisions de ce modèle sont davantage proches des teneurs mesurées dans les traitements 1 et 3 µg.L^{-1} de Cd comparé au traitement à 9 µg.L^{-1} de Cd (nominal).

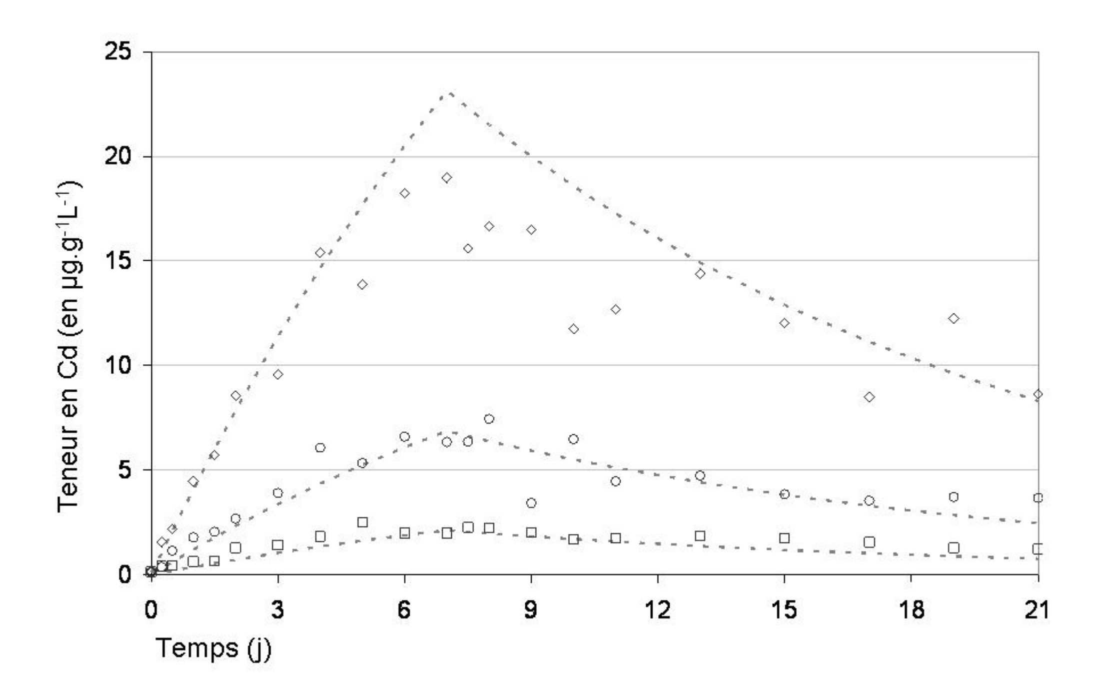


Figure 21 Modèle global de détermination des constantes toxicocinétiques du Cd dans *G. pulex*. Pour les traitements 1, 3 et 9 µg Cd.L^{-1}, les couples (k'_u ; k'_e) determinés sont respectivement de (0,60 ; 0,065), (0.50 ; 0.071), et de (0.42 ; 0.072).

Par la méthode DYM-BAM, le taux d'entrée par voie dissoute (k_u) est calculé à partir des influx initiaux de Cd. Les influx initiaux de Cd dans les gammares augmentent avec la concentration d'exposition de manière linéaire. La pente de la régression linéaire, c'est-à-dire k_u, est de 0,46 L.g^{-1}.j^{-1} avec un intervalle de confiance à 95% de [0.43 – 0.48] L.g^{-1}.j^{-1}. L'influx généré à 0,2 µg.L^{-1} n'a pas été pris en compte ici, il n'est pas significativement différent de zéro (p=0.24, valeur 0,05 ± 0.04 µg.g^{-1}.j^{-1}). Le taux d'entrée par voie dissoute calculé par la méthode DYM-BAM est donc peu différent de celui obtenu par la méthode globale.

Concernant l'interprétation de la dépuration, k_{dep} a été déterminé comme la moyenne des taux d'élimination des trois traitements 1, 3 et 9 µg.L^{-1}. Les trois taux de dépuration (taux d'élimination + dilution biologique) sont statistiquement égaux (ANCOVA p=0.952) et de pente 0,040 ± 0.010 (IC95%) j^{-1}, cf. Figure 22.

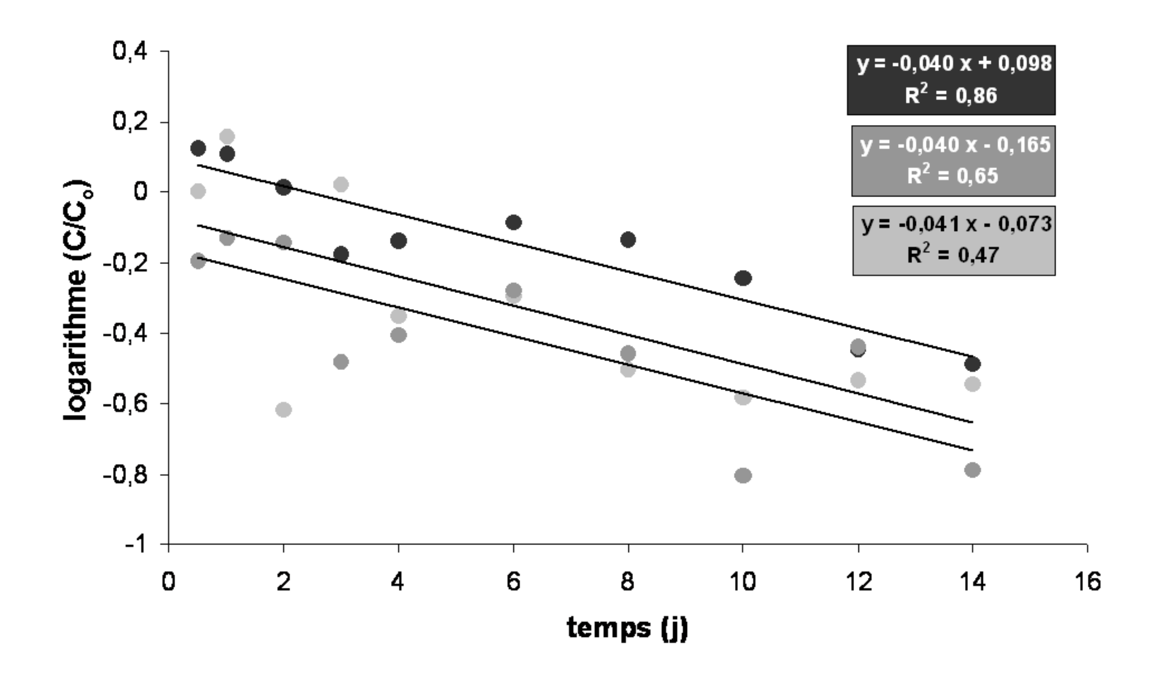


Figure 22 Pentes décroissantes des modèles log-linéaires appliqués pour interpréter les décroissances des teneurs en Cd des gammares lors des dépurations, suite aux accumulations à 1 µg.L^{-1} Cd (noir), 3 µg.L^{-1} Cd (gris clair) et 9 µg.L^{-1} Cd (gris foncé). Abrev. : C, teneur en Cd dans les gammares, C_O teneur en Cd en début de dépuration à *t*=7j.

A cette décroissance exponentielle, nous avons retranché une contribution de la dilution biologique de 0,009 j^{-1}, calculée à partir de l'évolution des poids des gammares durant cette phase de l'expérience. Le taux d'élimination k_{dep} est donc de 0,032 ± 0.010 (IC95%) j^{-1}. L'élimination du Cd lors de la dépuration a donc été particulièrement lente chez le gammare, avec un temps caractéristique d'environ 22,7 jours pour des teneurs comprises entre 1 et 20 µg.g^{-1}.

Le taux d'élimination k_{dep} est donc inférieur à la moitié du paramètre k'_{dep}. Aux deux méthodes ne peuvent donc que correspondre deux interprétations différentes concernant la nature du phénomène d'élimination du Cd par le gammare. La méthode globale s'attache à rendre compte d'une "résistance" aux échanges de Cd entre le gammare et le milieu, quelle que soit la situation d'exposition (le mot est choisi par analogie avec un système physique qui perd de l'énergie par frottement ou par perte en chaleur) alors que k_{dep} caractérise le phénomène d'élimination lors de la dépuration uniquement.

En conclusion, les deux méthodes estiment des taux d'entrée par voie dissoute similaires et des taux d'élimination différents. Seuls les paramètres du modèle DYM-BAM ont été validés en terme d'utilisation pour la prédiction des teneurs in situ des invertébrés aquatiques ; cette validation est le fruit de nombreux travaux méthodologiques et de modélisation présentés ci-avant dans l'état des connaissances. C'est pourquoi nous avons poursuivi les recherche ultérieures en se fondant sur ces paramètres. Par ailleurs, la méthode issue du modèle DYM-BAM donne accès au k_u avec moins de points de mesure que la méthode globale.

II.1.2.3 Influence de ligands organiques dissous sur la biodisponibilité du Cd pour G. pulex et apport de la mesure du métal labile

Les teneurs en Cd dans les gammares augmentent avec le temps, de façon linéaire, lors des expositions réalisées en présence de ligands organiques. Les coefficients de détermination des régressions linéaires sont supérieurs à 0,8 (n=10, sur 7 jours d'accumulation).

La présence d'EDTA a causé une réduction significative de l'influx initial de Cd par rapport au traitement de même concentration totale en Cd dans l'eau minérale, cf. Tableau 3 et graphique $[Cd]_w$ de la Figure 23 (ANCOVA F=1.35, p<0.26). L'expérience HA10 a occasionné un influx de Cd similaire à celui causé par la contamination à 3 µg.L^{-1} en eau minérale, c'est-à-dire à une concentration dissoute en Cd plus de deux fois inférieure. A l'inverse, l'influx initial ne diminue pas significativement dans le cas de HA5 (ANCOVA F=8.22, p<0.029) par rapport au cas comparable dans l'eau minérale. Donc les HA n'ont réduit significativement la biodisponibilité du Cd qu'à partir d'une concentration supérieure à 5 et inférieure à 10 mg.L^{-1} d'HA.

Expérience	$[Cd]_w$	$[Cd]_{inorg}$	$[Cd^{2+}]$	$[Cd]_{DGT}$	σ	Influx	IC-95%
	µg.L^{-1}	µg.L^{-1}	µg.L^{-1}	µg.L^{-1}	µg.L^{-1}	µg.g^{-1}.j^{-1}	µg.g^{-1}.j^{-1}
Eau minérale seule	<0,03	NA	NA	0,003	0,06	0,03	-0,02-0.08
1 µg.L-1 Cd	0,80	0,80	0,48	0,80	0,09	0,44	0,28-0.61
3 µg.L-1 Cd	2,66	2,66	1,58	2,56	0,29	1,19	0,81-1.58
9 µg.L-1 Cd	8,80	8,80	5,24	8,64	0,97	3,91	3,13-4.68
EDTA	8,70	5,31	2,78	5,05	0,63	2,85	2,06-3.64
HA5	8,92	5,71	3,41	5,90	0,28	3,81	2,88-4.74
HA 10	6,35	2,73	1,62	3,42	0,26	1,79	1,36-2.22

Tableau 3 Spéciation du Cd estimée par DGT et modélisé sous VMINTEQ, pour toutes les expériences. Abrev. : intervalle de confiance à 95% (IC-95%), Cd total dissous ($[Cd]_w$), labile ($[Cd]_{dgt}$), inorganique $[Cd]_{inorg}$, concentration de l'ion libre ($[Cd^{2+}]$). Ces deux dernières fractions de $[Cd]_w$ ont été modélisées à l'aide du logiciel VisualMINTEQ 3.24 en choisissant le modèle NICCA-DONNAN de description des acides humiques.

En présence de ligands organiques, les concentrations labiles sont inférieures aux concentrations dissoutes dans les trois milieux organiques (cf. Tableau 3) et égales à la somme des concentrations en espèces inorganiques du Cd modélisées à l'aide du logiciel VisualMINTEQ. La différence entre concentration labile et dissoute s'interprète ici comme la fraction complexée par les HA ou l'EDTA. On pouvait s'attendre à ce résultat, car il a été montré que les espèces métalliques complexées par les acides humiques ne participent pas à la fraction labile des DGT munies de gel "restrictifs", du fait d'une exclusion de taille liée aux propriétés du polymère dont est fait le gel de diffusion (Zhang et Davison, 2000). Le maintien d'un influx initial égal à l'inorganique pour le traitement HA5 laisse penser qu'une partie du métal complexé était biodisponible, et à l'inverse les influx de Cd des traitements HA10 et EDTA semblent avoir répondu à la concentration en métal labile (ou inorganique) uniquement.

Nous avons enfin recherché quelle concentration en Cd (mesurée ou modélisée) permettait le mieux de prédire la bioaccumulation dans l'ensemble des traitements inorganiques et organiques. La concentration en Cd total en solution ($[Cd]_w$), celle en espèces inorganiques du Cd ($[Cd]_{inorg}$), celle en métal labile mesuré par DGT ($[Cd]_{dgt}$) et celle en ion libre ($[Cd^{2+}]$), ont été comparées en appliquant quatre modèles linéaires de régressions des influx initiaux en fonction des concentrations prédictives, cf. Figure 23.

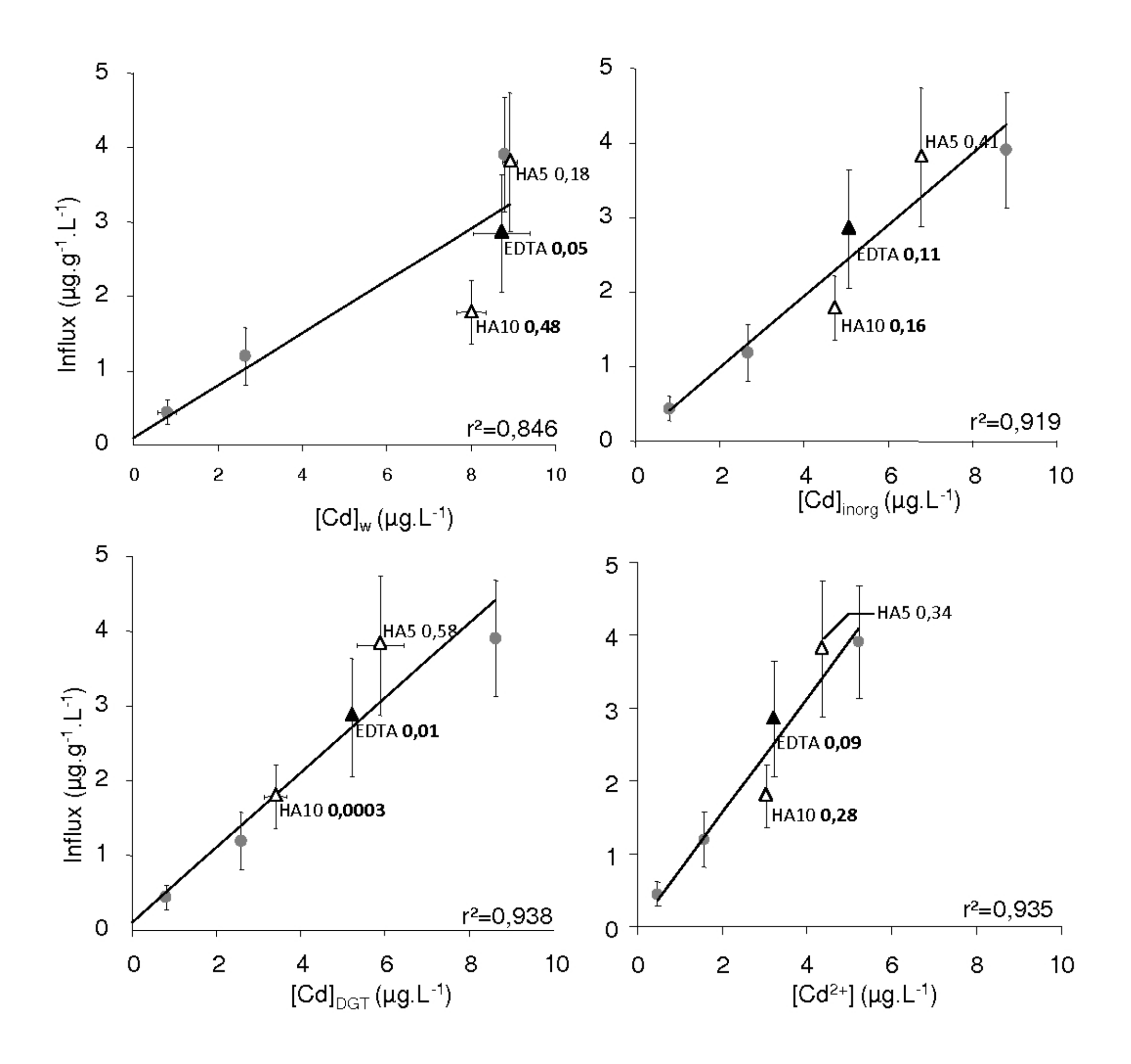


Figure 23 Comparaison des modèles linéaires de prévision des influx de Cd chez le gammare en fonction de la concentration totale en Cd (*[Cd]$_w$*), de la concentration en espèces inorganiques du Cd (*[Cd]$_{inorg}$*), de la concentration en métal labile mesuré par DGT (*[Cd]$_{DGT}$*) et de la concentration en ion libre (*[Cd^{2+}]*). Les traitements en eau minérale (●) sont distingués de celui avec ajout de 10 µg.L^{-1} d'EDTA (▲) et ceux avec ajout d'Acides Humiques Aldrich 5 mg.L^{-1}, HA5, et 10 mg.L^{-1} , HA10 (△).Les distances de Cook sont indiquées à gauche des noms des traitements avec ligands organiques.

Pour restreindre la comparaison des prédicteurs à un traitement donné en présence de ligands organiques, nous avons calculé les distances de Cook de certaines données (cf. Figure 23). La distance de Cook est d'autant plus importante qu'une donnée influe sur la pente de la droite de régression et/ou que son résidu est élevé. Les distances de Cook cumulées de EDTA et HA10 sont plus grandes avec [Cd]$_w$ qu'avec les trois autres prédicteurs, ce qui montre que la prise en compte de la spéciation améliore la performance du modèle linéaire de manière

générale. Le calcul de $[Cd^{2+}]$ ou de $[Cd]_{inorg}$ par modélisation ainsi que $[Cd]_{dgt}$ offrent tous une bonne prédiction de l'influx.

La concentration en métal labile est donc un bon prédicteur de la disponibilité du Cd à pénétrer dans le gammare, au moins autant explicatif que les calculs de spéciation réalisés, et ayant l'avantage d'être une mesure, indépendante des nombreux biais pouvant peser sur la modélisation de la MOD. Il est toutefois possible qu'il existe un ratio métal : ligands à partir duquel la diminution de la biodisponibilité du Cd soit moindre que celle liée à la diminution de la concentration en ions inorganiques du fait de la complexation par les acides humiques. L'influx de Cd bioaccumulé dans les traitements les plus complexant du Cd (HA10 et EDTA) pourrait donc être interprété dans le cadre d'un modèle à l'équilibre du type modèle de l'ion libre, sujet qui reste en débat dans les travaux précédemment publiés. En effet, les études de Van Ginneken et al. (2001) et de Ma et al. (1999) font état de la pertinence du modèle de l'ion libre pour interpréter l'effet de la complexation par les acides humiques respectivement sur la bioaccumulation du Cd dans les branchies de carpe et sur la bioaccumulation du cuivre chez la daphnie. Au contraire, Voets et al. (2004) ont montré dans le cas de la dreissène que, si la complexation par les acides humiques entraînait une baisse des influx de bioaccumulation de Cd, celle-ci est moindre que celle que l'on pourrait prévoir sur la base de l'activité de l'ion libre. Enfin, Ferreira et al. (2008) ont montré que l'introduction de bryophytes dans une solution d'acides humiques et de cuivre provoquait un déplacement d'équilibre, les bryophytes agissant comme un ligand plus puissant que les acides humiques. Dans ce cas, qui constitue une exception classique au modèle de l'ion libre car la solution extérieure ne reste pas à l'équilibre initial, le flux de bioaccumulation est proportionnel à une quantité supérieure à la concentration en métal libre. La réduction de la bioaccumulation des métaux en présence d'acides humiques ne suit donc pas systématiquement le modèle de l'ion libre. Néanmoins pour *G. pulex*, sauf dans un traitement de l'expérience réalisée (HA5), les influx initiaux de Cd sont proportionnels à la concentration *modélisée* en métal libre en solution.

II.1.2.4 Conclusions et perspectives

Les gammares exposés à une concentration en Cd constante dans l'eau l'accumulent de façon linéaire durant les quarante-huit premières heures d'exposition. Cette

linéarité permet de déterminer un taux d'entrée par voie dissoute qui n'est pas différent de celui d'un modèle toxicocinétique s'ajustant de manière globale (de façon non-linéaire) aux données d'accumulation et de dépuration. Cependant, la méthode DYM-BAM et la méthode globale, diffèrent quant à la valeur du taux d'élimination qu'elles utilisent. Nous avons retenu la méthode DYM-BAM dans la suite de cette thèse. De manière qualitative, les influx initiaux de Cd dans les gammares répondent à des changements de spéciation du Cd en solution en présence de matière organique comme le prouve la baisse très significative de l'influx à HA10. A même concentration nominale en Cd en milieu minéral, la présence de ligands organiques réduit les influx de bioaccumulation, c'est à dire la biodisponibilité du Cd.

Cette réduction s'explique par le changement de spéciation induit par la complexation du métal à l'EDTA ou aux acides humiques. Il est possible de modéliser ce phénomène ou de le prendre en compte en mesurant la concentration en métal labile. En effet, les influx de Cd chez les gammares augmentent de façon linéaire avec la concentration dissoute inorganique, la concentration en ion libre ou la concentration labile mesurée par DGT. Cette dernière a l'avantage d'être affranchie de toutes les hypothèses que la modélisation implique de faire sur les caractéristiques de la MOD. Cependant, l'influence quantitative d'une matière organique dissoute humique sur les influx n'est pas triviale. C'est pourquoi ce travail mérite d'être poursuivi pour explorer de manière quantitative le rapport entre les paramètres de complexation des métaux par la MOD (constante de complexation, ratio métal:ligand, etc.) et leur biodisponibilité en termes d'influx de bioaccumulation chez *G. pulex*. Une première piste dans ce champ de recherche serait de faire l'étude couplée des constantes thermodynamiques de complexation des métaux et de l'influence sur la biodisponibilité des métaux à partir de substances humiques davantage représentatives du milieu aquatique que les acides humiques Aldrich.

II.2 L'INFLUENCE DE LA COMPETITION CALCIQUE ET DE LA TEMPERATURE SUR L'ENTREE PAR VOIE DISSOUTE DU CD

Deux expériences ont été réalisées afin de mesurer d'éventuelles variations des influx de Cd dans *G. pulex* en fonction de la concentration du milieu d'exposition en calcium, nommée

expérience *calcium,* et de la température, nommée expérience *température*.

II.2.1 Matériel et méthodes

Un protocole d'exposition semi-statique a été développé, qui permet de mesurer les influx initiaux de Cd avec des simplifications matérielles importantes par rapport aux expériences précédentes. Assurer que ce nouveau dispositif maintient une concentration d'exposition constante a été le point clef de ce développement. Les volumes et les concentrations d'exposition ont été choisis afin de rendre inférieures à 5% les variations des concentrations en Cd dues à la bioaccumulation par les gammares. Pour l'expérience *calcium* il a été tenu compte du taux d'entrée par voie dissoute mesuré à $[Ca^{2+}]$=99mg.L^{-1} et l'eau des béchers a été renouvelée chaque demi-journée à partir du même stock d'eau contaminée, durant toute l'expérience et pour chaque couple (Ca, Cd). L'expérience *température* a été conduite intégralement dans de l'eau à 3,5 mg.L^{-1} de Ca (eau de source de Montfras, 1®, Chambon, France) car l'expérience *calcium*, conduite antérieurement, avait montré qu'une dureté calcique faible favorise une pénétration plus rapide du Cd dans les gammares. Un volume d'eau par gammare sept fois plus important a été choisi (70 gammares dans des aquariums de 15L) car cette expérience a été menée sans renouvellement de l'eau (afin d'assurer la stabilité en température). Dans les deux cas, les bacs ont été pré-exposés 24h avant le début de l'expérience afin de palier à une éventuelle absorption de Cd sur les parois. Le plan d'expérience suivi est présenté Figure 24 : l'influence de la concentration en calcium sur l'accumulation de Cd, par exemple, a été étudiée en mesurant les influx de Cd dans des milieux d'exposition à des concentrations nominales en Cd de : 0 µg.L^{-1}, 1 µg.L^{-1}, 3 µg.L^{-1}, 9 µg.L^{-1}, préparées dans des eaux à 3.5 mg.L^{-1}, 88 mg.L^{-1}, 174 mg.L^{-1}.

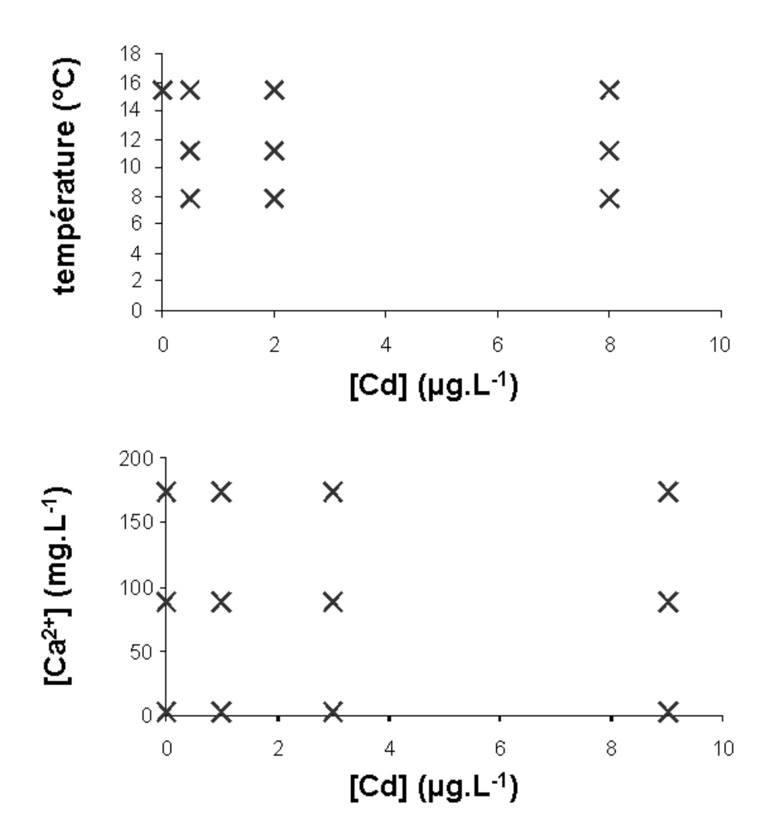


Figure 24 Plan des expériences d'exposition de *G. pulex* à une plage de concentrations de cadmium à différentes températures et concentrations calciques. Une croix représente un aquarium de l'expérience température ou trois béchers dans l'expérience calcium.

Les solutions de Cd ont été préparées à partir d'une solution mère à 1 g.L^{-1} de Cd, obtenue par dissolution de nitrate de Cd (CdN_2O_6+4(H_20)) dans de l'eau distillée. L'eau de source Gand Barbier (Carrefour, France) a été utilisée pour les traitements à la dureté la plus faible, et celle de la source Montfras à Chambon (1®, France) pour les traitements à dureté moyenne. A partir de cette dernière, l'eau de dureté maximale a été préparée par ajout de 2,230 g de Chlorure de Calcium hydraté $CaCl_2$, 2(H_20). La concentration en calcium a été contrôlée à deux reprises, aux temps 12 et 36 heures, pour chaque "couple"(Ca, Cd). Les paramètres physico-chimiques des eaux utilisées sont indiqués en annexe au Tableau 12. La température a fait l'objet d'un suivi automatique par sonde de température (Prosensor, Amanvillers, France). *G. pulex* vit à des températures de l'eau comprises entre 2 et 17 °C (Peeters et Gardeniers, 1998), les températures choisies lors de cette expérience couvrent une plage haute, entre 8 et 15 °C.

L'eau a été échantillonnée trois fois (aux temps t=12, 24 et 48 h pour *calcium* et t=0, 24 et 48h pour *température*). Après acidification à 1% du volume prélevé par 50 µL d'acide

nitrique suprapur (Merck), les échantillons d'eau ont été analysés par AAS.

Les gammares ont été affamés durant cinq jours précédents les expériences afin d'éviter la défécation pour préserver une concentration faible en matières organiques dans les bacs d'exposition. Ils ont été exposés durant 48h aux concentrations nominales en Cd présentées Figure 24, après avoir été acclimatés durant cinq à sept jours aux différentes duretés calciques choisies à T=11°C. Des groupes de 5 gammares ont été prélevés à t= 12, 24, 36 et 48 h dans l'expérience *calcium*, et t= 6, 12, 24 et 48 h dans l'expérience *température,* ainsi que trois groupes dans les bacs d'acclimatation juste avant le début de l'exposition. Les prélèvements de gammares ont été faits en triplicats pour chaque couple (Ca, Cd) et (T, Cd). Après prélèvement, les gammares ont été abondamment rincés à l'eau du robinet, puis séchés à l'étuve pendant deux jours (45°C), pesés et minéralisés par digestion acide à l'acide nitrique (1j, 50 µL par mg de matière sèche de gammare traité) et au peroxyde d'hydrogène (6j, 20 µL par mg idem). Un volume de ce minéralisat a été dilué dans dix volumes d'eau avant analyse par AAS.

II.2.2 Résultats et discussion

II.2.2.1 La concentration en calcium influe sur le taux d'entrée par voie dissoute

Les concentrations mesurées en Cd de l'eau sont présentées au Tableau 4, elles sont restées constantes durant l'exposition. Elles concordent avec les concentrations nominales sauf dans le cas des traitements à 200 mg.L^{-1} de Ca^{2+}. En première hypothèse, il a été supposé que les ions chlorures introduits (dans les quatre traitements de plus forte dureté, sous forme $CaCl_2$) aient empêché la volatilisation totale du Cd lors de l'analyse par spectrométrie AAS, provoquant une sous-estimation de la concentration. Cependant après avoir ré-analysé une dizaine d'échantillons par la méthode des ajouts dosés, avec laquelle la détermination de concentration en analyte est indépendante de la concentration en ions chlorures, nous avons vérifié que la présence d'ions chlorures ajoutés n'était pas la cause de cette différence. Cette différence a pu s'expliquer par une sédimentation en fond de bac d'une partie du Cd, après une précipitation du Cd avec les carbonates. Pourtant la modélisation par VisualMINTEQ de la spéciation des solutions indique que le log du produit des activités de Cd et de CO_3^{2-} n'était supérieur au produit de solubilité de $CdCO_3$ que pour le traitement à 9

µg.L^{-1}. Dans les deux autres cas, le produit des activités est entre 2 et 7 fois inférieure au produit de solubilité de $CdCO_3$, situation qui ne garantit pas que la précipitation n'ait pas pu avoir lieu du fait des incertitudes sur la composition chimique intégrale de l'eau et sur l'adéquation des constantes thermodynamiques à la solution réellement utilisée.

La Figure 25 donne une vue d'ensemble de l'augmentation des influx initiaux de Cd dans les gammares aux différentes concentrations en Ca^{2+} et en Cd. Dans les trois milieux, les influx initiaux en Cd ont augmenté linéairement par rapport aux concentrations en Cd mesurées, les r^2 allant de 0,81 à 0,91.

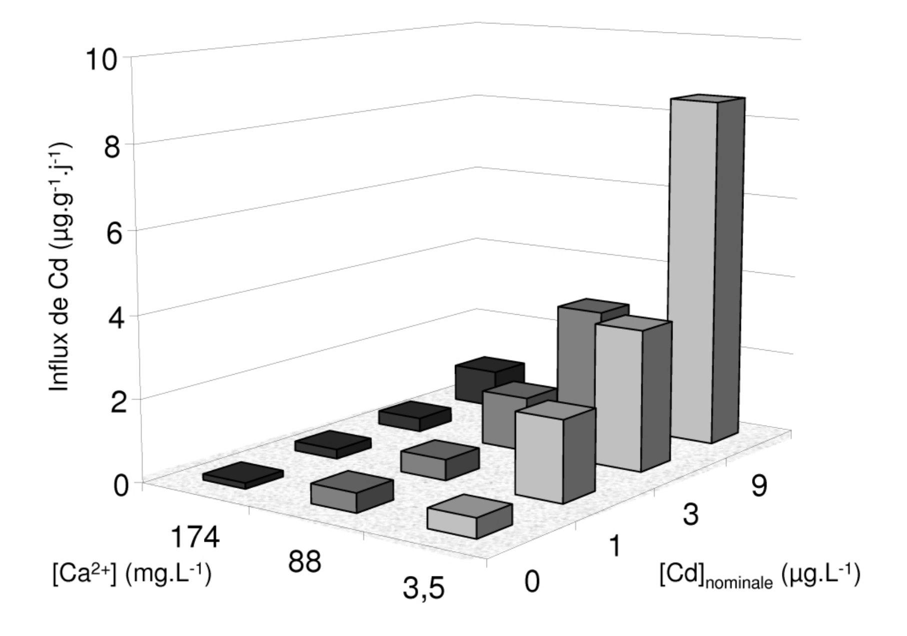


Figure 25 Influx de Cd chez *G. pulex* sur une plage de concentration en Cd et en [Ca^{2+}]. Les concentrations en [Ca^{2+}] sont celles mesurées, inférieures quelques pourcents aux concentrations nominales.

Le taux d'entrée par voie dissoute diminue très significativement en fonction de la concentration en calcium (ANCOVA, $p=2.10^{-16}$), cf. Figure 26. Ainsi, à chaque concentration en Ca^{2+}, un taux d'entrée par voie dissoute du Cd a pu être déterminé.

	[Cd] nominale (µg.L^{-1})			
[Ca^{2+}] nominale	0	1	3	9
4	0,06 ± 0,06	1,11 ± 0,03	2,70 ± 0,16	8,36 ± 0,05
96	0,08 ± 0,01	0,95 ± 0,13	2,97 ± 0,19	8,69 ± 0,28
200	0,18 ± 0,05	0,37 ± 0,03	0,74 ± 0,10	3,56 ± 0,87

Tableau 4 Concentrations en Cd total en µg.L^{-1} mesurées dans les expériences semi-statiques sur l'influence du calcium sur l'entrée du Cd par voie dissoute chez le gammare. Moyenne ± E-T.

Un modèle de Michaelis-Menten-Henri est proposé pour rendre compte de la diminution du taux d'entrée par voie dissoute en fonction de la concentration en calcium, compétiteur connu du transport du Cd. Dans le cadre d'un tel modèle, les influx de Cd sont conçus comme une conversion de Cd externe à l'organisme en Cd internalisé. L'influx de Cd (I) dépend alors de deux paramètres : l'affinité apparente du substrat (Cd) pour le transporteur (K'_m) et la vitesse maximale d'internalisation (V_{max}, qui est proportionnelle à la densité de sites de transport du Cd) selon l' Équation 12 (Buchwalter et Luoma, 2005) :

Équation 12

$$I = \frac{V_{max}.[Cd]}{K'_m + [Cd]}$$

Par ailleurs, k_u est un rapport entre un influx de Cd et une concentration en Cd biodisponible. En divisant les deux membres de l'Équation 12 par [Cd], et dans la limite des faibles [Cd] (devant K_m), on obtient l'Équation 13 :

Équation 13

$$k_u = \frac{V_{max}}{K'_m}$$

En outre, si l'on suppose que le calcium est un inhibiteur compétitif du Cd, c'est-à-dire que seule la réaction du calcium avec le substrat inhibe la réaction de celui-ci avec le Cd, l'affinité apparente (K'_m) varie en fonction du calcium selon l'Équation 14:

Équation 14

$$K'_m = K_m.(1+\frac{[Ca^{2+}]}{K_{Ca}})$$

où K_m est l'affinité intrinsèque du transporteur pour le Cd, en mol.L^{-1}, et K_{Ca} la constante d'inhibition de la réaction par le calcium, en mol.L^{-1}. Enfin, on déduit des Équations 4 et 5, que le taux d'entrée du Cd varie en fonction de [Ca^{2+}] selon l'Équation 15:

Équation 15

$$k_u([Ca^{2+}]) = \frac{k_u(0)}{1+\frac{[Ca^{2+}]}{K_{Ca}}}$$

L'ajustement du modèle aux données mène à une constante d'inhibition K_{Ca} de 66 mg.L^{-1}, et à $k_u(0)$=0,86 L.g^{-1}.j^{-1}, cf. Figure 26.

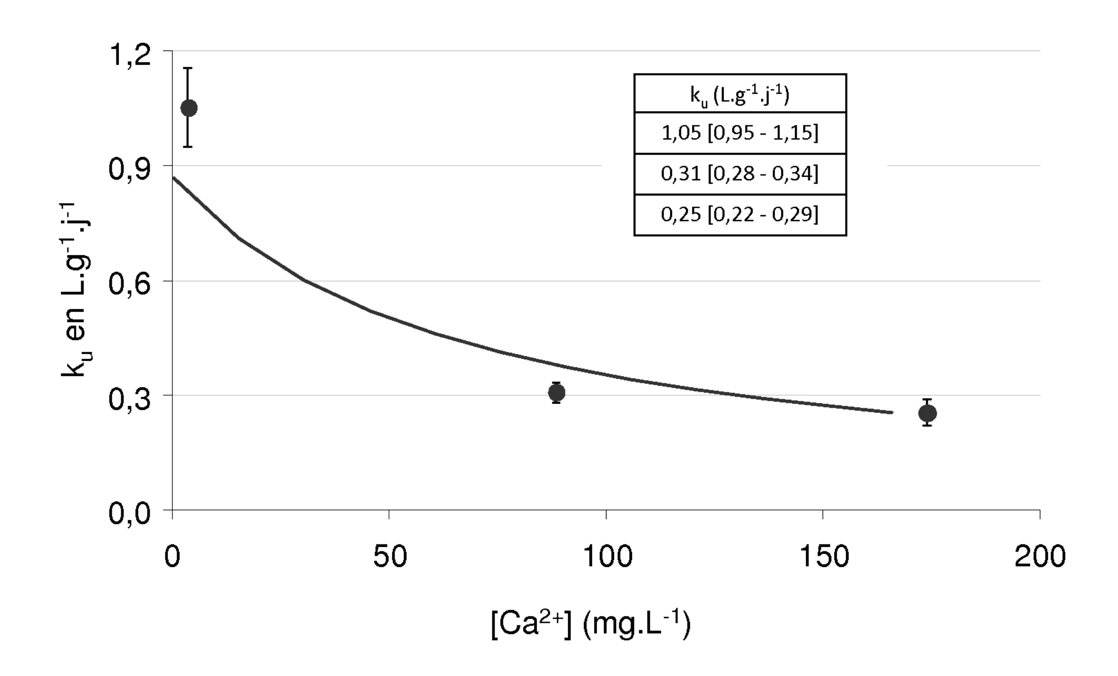


Figure 26 Courbe michaelienne d'interprétation de la décroissance du taux d'entrée par voie dissoute du Cd chez *G. pulex* en fonction de la compétition par la concentration en ion Ca^{2+}. Dans l'encadré sont indiqué les intervalles de confiance à 95% autour de la valeur moyenne des taux d'entrée par voie dissoute à différentes duretés calciques de l'eau.

Stephenson et Mackie (1989a) ont mis en évidence l'effet inhibiteur du calcium sur la bioaccumulation à l'équilibre (après 10 jours) du Cd chez l'amphipode d'eau douce *Hyallela*

azteca sur une plage beaucoup plus restreinte que dans notre étude (de 2,5 à 6,5 mg .L^{-1} de calcium). Nous retrouvons et quantifions cet effet sur le taux d'entrée par voie dissoute dans notre étude. De plus, les influx de Cd dans les gammares en tant qu'outil d'évaluation de la biodisponibilité du Cd (cf. expérience en présence de ligands organiques, l'eau était à 99 mg.L^{-1} lors de cette expérience) seraient donc plus élevés en choisissant une eau peu dure, ce qui laisse encore des marges d'optimisation de l'étude de la biodisponibilité du Cd dans le cadre présenté.

Ce modèle suppose que la densité de sites de transport du calcium est une constante chez l'espèce *G. pulex*. Cette hypothèse nous semble celle la plus discutable du modèle, dans la mesure où il est connu que les gammares s'adaptent à (presque) toutes les duretés des eaux naturelles (Peeters et Gardeniers, 1998) et que cette adaptation pourrait résulter de façon plausible d'une régulation de la densité de sites de transport du calcium.

II.2.2.2 La température influe peu sur le taux d'entrée par voie dissoute

Les concentrations mesurées en Cd de l'eau des bacs à différentes températures sont présentées Tableau 5. Elles furent conformes à la contamination nominale recherchée. Dans l'eau minérale utilisée, ces concentrations totales en Cd mesurées peuvent être assimilées à la concentration en Cd dissous. Les influx initiaux de Cd ont augmenté de façon linéaire en fonction des concentrations en Cd mesurées, avec des r^2 allant de 0,60 à 0,95 dans tous les bacs sauf pour les deux traitements correspondants aux couples (0,5 µg.L^{-1}, 7,8 °C) et (0,5 µg.L^{-1}, 15,4 °C) où ils ont été respectivement de 0,38 et 0,14. Les écarts à la linéarité dans ces deux traitements n'ont pas eu d'incidence majeure sur la variabilité mesurée autour du taux d'entrée par voie dissoute aux deux températures de 7,8°C et 15,4°C.

L'augmentation de k_u avec la température a été significative (ANCOVA, p=0.018). Cependant le phénomène ne montre qu'une ampleur maximale de 30%. En conséquence, la correction de k_u en fonction de la température pourrait s'avérer négligeable devant les incertitudes expérimentales, analytiques et biologiques. En l'état actuel des connaissances, on estime que la prédiction d'une bioaccumulation de métaux dans les invertébrés est "correcte" lorsqu'elle n'est pas distante de l'observation de plus d'un facteur 2 en plus ou en moins (Luoma et Rainbow, 2005).

	$[Cd]_{mesurée}$ ($\mu g.L^{-1}$)				k_u ($L.g^{-1}.j^{-1}$)
$[Ca]_{nominale}$ ($mg.L^{-1}$)	0	0.5	2	8	
Bac à 7,8°C		0,62 ± 0,18	2,29 ± 0,63	7,72 ± 0,29	1,06 [0,97 - 1,15]
Bac à 11,2°C		0,51 ± 0,01	1,87 ± 0,09	7,77 ± 0,41	1,00 [0,81 - 1,18]
Bac à 15,4°C	<LQ	0,50 ± 0,03	1,92 ± 0,10	7,54 ± 0,51	1,34 [1,17 - 1,5]

Tableau 5 Concentrations totales en Cd ($\mu g.L^{-1}$) dans les bacs d'exposition lors de l'expérience sur l'influence des variations de température sur le taux d'entrée par voie dissoute du Cd chez *G. pulex*. Le sigle <LQ indique la concentration en Cd n'a pas été quantifiée car le signal était inférieur à la limite de quantification de la méthode (0,09 $\mu g.L^{-1}$)

Zauke (1982) a établi une corrélation entre la teneur en Cd des gammares autochtones et la température de l'eau. Les résultats de notre étude montrent que le lien de cause à effet résiderait davantage dans une influence de la température sur d'autres processus contribuant à la bioaccumulation que celui de l'entrée du métal par voie dissoute. Maltby et al. (2002) ont d'ailleurs montré que la température contrôlait de manière importante le taux de nutrition des gammares. La voie trophique de contamination pourrait donc être contrôlée par la température. Enfin, Zauke (1982) a proposé l'hypothèse que la constante de dépuration des gammares pourrait subir l'influence de changements de température, ce qui n'a pas encore été montré à notre connaissance.

II.2.3 Conclusions et perspectives

Les influx d'entrée du Cd par voie dissoute chez *G. pulex* ne sont pas contrôlés que par la spéciation du métal en solution mais également par la dureté calcique de l'eau. Par comparaison, les changements de température ne modifient que peu les influx et donc sur le taux d'entrée par voie dissoute. Néanmoins, d'autres variables chimiques du milieu comme le pH ou la concentration en Zn pourraient avoir une influence sur ces influx et mériteraient de plus amples recherches.

II.3 TOXICO-CINETIQUES DU B[A]P DISSOUS EN EAU MINERALE

II.3.1 Repères sur le B[a]P en milieu aquatique

Le benzo[a]pyrène (B[a]P) fait partie des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). L'origine anthropique des HAP est majoritaire par rapport aux sources naturelles que sont les feux de forêts et les éruptions volcaniques. Les HAP sont présents dans les combustibles fossiles et leurs fumées, et proviennent aussi de la combustion incomplète d'huiles, de bois, de tabac et d'autres matières organiques. Par exemple, la fumée totale d'une cigarette contient environ 0,015 µg de B[a]P (Evans et al., 1993). La concentration totale en B[a]P dans les rivières est très variable en fonction de la présence ou non d'activités humaines à proximité du cours d'eau et peut s'élever jusqu'au $\mu g.L^{-1}$ à l'aval d'effluents industriels (Neff, 1979). Du fait de son hydrophobicité (log K_{ow} =6), le B[a]P est davantage susceptible d'être associé aux particules et matières organiques de la colonne d'eau.

En raison de sa toxicité, sa persistance et ses propriétés de bioaccumulation, le B[a]P fait partie de la liste des substances prioritaires dangereuses visées dans la directive cadre européenne sur l'eau 2000/60/DCE. A ce titre, les états membres de l'union européenne doivent tendre à éliminer complètement sa présence dans leurs eaux. Dans la Seine, Mouchel et al. (2008) ont mesuré des teneurs en B[a]P dans l'eau en aval du déversoir de Clichy de 0,25 $ng.L^{-1}$ (fraction dissoute) et 2 $ng.L^{-1}$ (fraction particulaire). Le B[a]P compte parmi les HAP cancérogènes. C'est pourquoi il a été sélectionné dans cette étude comme molécule modèle. Sa génotoxicité chez les organismes aquatiques repose sur la formation d'adduits à l'ADN pour certains de ses métabolites.

II.3.1.1 Bioaccumulation du B[a]P par voie dissoute

Le mécanisme de la bioaccumulation par voie dissoute du B[a]P chez les invertébrés est lié à la respiration. Mac Carthy (1983b) a montré que les daphnies mortes (tués thermiquement) accumulaient le B[a]P environ dix fois moins vite que celles vivantes exposées par voie dissoute seule. D'où il ressort que l'accumulation par voie dissoute du B[a]P par ce crustacé n'est pas qu’un processus chimique passif, comme de la diffusion par exemple. Par surcroît, Landrum et Stubblefield (Landrum et Stubblefield, 1991) ont montré qu'il existe, pour

l'amphipode *Diporeia sp.* une corrélation significative entre le taux d'entrée d'oxygène par voie dissoute et celui du B[a]P.

En outre, la biodisponibilité du B[a]P est réduite en présence de MOD et cela est expliqué dans la revue de Haitzer et al. (Haitzer et al., 1998). Ceci a été montré en particulier dans le cas des acides humiques Aldrich à des concentrations entre 1 et 5 $mg.L^{-1}$ de DOC, chez la daphnie (Gourlay et al., 2003), et chez l'amphipode benthique *Diporeia* (Landrum et al., 1985) (avec du benzo[a]anthracène). Ces constatations ont conduit plusieurs auteurs à formuler l'hypothèse du "polluant libre" selon laquelle seul le contaminant non associé à la matière organique dissoute serait biodisponible.

II.3.1.2 Bioaccumulation du B[a]P par voie trophique

Le B[a]P adsorbé sur la nourriture est assimilable (par voie trophique) par les invertébrés d'eau douce, par exemple chez la dreissène (Gossiaux et al., 1998) et chez l'amphipode d'eau douce *Diporeia* (Kukkonen et Landrum, 1995b). Chez ces deux organismes en laboratoire, des efficacités d'assimilation (AE) du B[a]P ont été mesurées. L'AE est la proportion (en %) de métal présent dans la nourriture qui traverse la paroi digestive lors de l'ingestion d'un bol alimentaire contaminé (Wang et Fisher, 1999). Une AE significativement différente de zéro prouve donc la possibilité de la bioaccumulation par voie trophique et permet de comparer les apports par voie trophique et dissoute lorsque cette dernière connue. Chez l'espèce *Diporeia* par exemple, amphipode détritivore et benthique, Kukonnen et Landrum (1995b) ont mesuré une AE du B[a]P entre 45 à 57% lors d'un essai de 10 jours durant lequel les amphipodes se nourrissaient de sédiments naturels dopés en B[a]P. De manière étonnante, certains résultats de l'étude en laboratoire de Richter et Nagel (2007) tendent à prouver que le B[a]P ne serait pas bioaccumulé par voie trophique chez les gammares d'eau douce (*Gammarus fossarum* se nourrissant de disques d'aulne contaminés). La conclusion de cette étude nous semble contradictoire avec les nombreux résultats montrant une assimilation par voie trophique des contaminants hydrophobes chez les amphipodes, y compris chez les gammares d'eau douce. Par exemple, chez *Gammarus fasciatus* se nourrissant des fèces de dreissènes, Bruner et al. (1994) ont mesuré des efficacités d'assimilation de polychlorobiphényles de 80 à 90%. Les polychlorobiphényles présentent des hydrophobicités proches du B[a]P et il y a peu de raisons de penser que le B[a]P soit assimilé d'une

manière différente de celle des PCB par voie trophique (Wang et Fisher, 1999). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent donc qu'à la voie dissoute de bioaccumulation du B[a]P chez les gammares pourrait s'ajouter un apport trophique.

Les HAP ont une tendance forte, due à leur hydrophobicité, à s'associer avec les matières organiques dans l'eau ou au contact de l'eau, comme par exemple dans le sédiment (Kukkonen et Landrum, 1995a), dans les matières organiques dissoutes (McCarthy et al., 1989), dans le phytoplancton, et les particules en suspension (McLeod et al., 2004). On peut s'attendre à ce que la tendance importante des HAP à s'associer aux matrices organiques induise une prédominance de la voie trophique de contamination chez certains invertébrés (Kukkonen et Landrum, 1995b). Cependant, dans le cas précis de la bioaccumulation du B[a]P par les gammares, il reste difficile de prouver en milieu naturel que cette voie de contamination n'est pas négligeable. A notre connaissance, seule l'étude de Howell et al. (1996) sur la contamination des MES, des gammares et des dreissènes (*Gammarus fasciatus* et *Dreissena polymorpha)* du port Hamilton sur le lac Ontario, conduit à supposer que la voie trophique de bioaccumulation des HAP contribue significativement à la teneur observée *in situ* chez les gammares d'eau douce. Cette étude établit un lien de cause à effet entre la contamination des MES et celle des organismes, sur la base des gradients de contamination constatés et en comparant les profils de contamination en HAP dans les différentes matrices en différents lieux (elle fournit, par ailleurs, un intervalle de valeurs possibles des teneurs poids sec en B[a]P dans les gammares, 0,04 $\mu g.g^{-1}$ furent mesurés en site de référence contre 1,4 $\mu g.g^{-1}$ au site le plus contaminé).

II.3.1.3 Conclusion et problématique

Le B[a]P est présent à de faibles concentrations dans l'environnement, de l'ordre du dixième de ng par litre dans l'eau et du $ng.g^{-1}$ dans les particules en suspension. Lors d'expositions en laboratoire, il est bioaccumulé par les amphipodes d'eau douce par voie dissoute et par voie trophique (La voie trophique de contamination a été mise en évidence chez un gammare benthique, vivant en partie enfoui dans le sédiment, mais pas chez *Gammarus fossarum*). Sur le terrain il reste difficile de déterminer quelle est la voie principale de contamination des gammares en HAP.

La méthodologie du modèle biodynamique (Luoma et Rainbow, 2005) a montré sa pertinence dans le cas des métaux traces. En outre elle permet, dans ce cas, de donner une estimation de l'importance relative des deux voies de contamination (eau et nourriture). Cette méthodologie est-elle adaptable pour les contaminants organiques hydrophobes dans les gammares ? Nous avons dans un premier temps cherché à établir, lors d'une étude en laboratoire, un lien entre l'exposition par voie dissoute et la bioaccumulation du B[a]P, comme essai préliminaire pour tenter d'avancer sur cette question.

II.3.2 Toxicocinétique du B[a]P dissous chez *G. pulex*

L'augmentation des cinétiques d'entrée par voie dissoute du B[a]P avec sa concentration en solution a déjà été montrée pour plusieurs organismes aquatiques (Landrum et al., 2003; Richter et Nagel, 2007). Nous cherchons ici à préciser ce lien chez le *G. pulex* en :

- testant la validité d'un modèle linéaire permettant de lier concentrations dissoutes et vitesses d'entrée du B[a]P.
- testant la capacité des gammares à éliminer ou à métaboliser le B[a]P

Pour cela nous avons conduit des toxicocinétiques (expositions suivies d'une dépuration) en conditions physico-chimiques contrôlées en laboratoire.

II.3.2.1 Matériel et Méthodes

Produits et organismes d'étude

L'acétone, le méthanol et le dichlorométhane utilisés étaient de pureté p.a. (Carlo Erba, for pesticids analysis, purity>99.8% water<0.05%). Une solution mère de B[a]P à 64 $mg.L^{-1}$ a été constituée dans 50 mL d’acétone à partir de BaP en poudre (pureté: 98%, Aldrich, Steinheim, Germany). La solution de dopage utilisée, de concentration nominale 3,2 $mg.L^{-1}$, a été obtenue par dilution de la solution précédente dans du méthanol.

Mille deux cents gammares ont été prélevés dans la Bourbre à L'Isle D'Abeau (Isère, France), le 07/04/2006 et triés par classes de taille. Les individus adultes mesurant entre 10 et 15 mm ont été rapportés au laboratoire et acclimatés progressivement durant 4 jours à l'eau minérale de l'expérience. Une alimentation constituée de feuilles d'aulne conditionnées a

été pourvue jusqu'à deux jours avant le début de l'exposition.

Expérience

Les gammares ont été exposés durant une semaine à différentes concentrations en B[a]P. Afin de maintenir une présence minimale de matières organiques durant l'exposition, les gammares étaient à jeun et n'étaient pas nourris durant cette phase. Ensuite, une phase de quinze jours de dépuration a été réalisée en eau minérale non-contaminée, avec nourriture proposée ad-libitum aux gammares (feuille d'aulne).

Quatre traitements, nommés C (pour contrôle), B (basse concentration), M (moyenne) et H (haute), ont été mis en place, de concentrations nominales en B[a]P dissous respectivement de : 0- 0,118- 0,355 et 1,066 $\mu g.L^{-1}$. Les gammares ont donc été exposés à une concentration dissoute égale à la norme de qualité environnentale, cf. paragraphe I.1.1.2, lors du traitement B. Chaque traitement a nécessité un ensemble de dix béchers en verre alimentés par un système de flux continu d'eau contaminée[12] (par goutte à goutte), avec quarante gammares par bécher. L'eau du traitement C n'a subi aucun ajout. L'eau alimentant les traitements B, M et H a été contaminée à partir d'un réservoir unique de 20 L d'eau minérale dopée à 3,2 $\mu g.L^{-1}$ de B[a]P. Trois dilutions successives de ce réservoir ont été réalisées en permanence et automatiquement dans trois récipients de mélange en amont des béchers, grâce à un système de pompes péristaltiques. Le système (sans les gammares) a été pré-exposé à la solution contaminée 20 h avant le début de l'expérience. Un cycle jour:nuit de (16:8) h a été respecté. En moyenne durant la phase d'exposition, l'eau était à 10,8°C et la luminosité de 191 Lux (moyenne en période éclairée). Une mortalité inférieure à 10% a été observée lors des expériences, similaire dans B, M et H à celle de l'expérience C.

Teneur en B[a]P des gammares

Trois échantillons de gammares ont été prélevés par groupe de cinq individus aux temps : *t*=0,52- 1,02- 1,5- 2- 2,92- 6,0 et 7,31 jours en phase d'accumulation et *t'*=0,61- 0,94- 1,69- 4,48- 6,69- 12,69 et 14,84 en phase de dépuration.

[12] Le système utilisé pour les toxico-cinétiques du Cd, présenté en Figure 18 a été adapté au cas du B[a]P.

Après rinçage à l'eau distillée (deux fois 10 mL par groupe de gammares) et congélation durant 48h à -80°C, les gammares furent lyophilisés, broyés puis pesés. Une extraction et une purification des hydrocarbures aromatiques polycycliques d'environ 20 mg de ces broyats de gammare ont été réalisées en suivant le protocole indiqué en annexe. Enfin, l'analyse du B[a]P des échantillons a été conduite en GC-MS en mode « single ion monitoring » au Laboratoire de Physico-Toxicochimie des Systèmes Naturels (UMR 5472 CNRS, LSA, Université Bordeaux 1, France). Des premières analyses sur les teneurs en B[a]P dans les gammares en fin de phase d'exposition ont montré que seuls ceux de l'expérience H dépassaient la limite de quantification de la méthode (équivalente à environ 0,03 $\mu g.g^{-1}$ de matière sèche de gammare). Seul ce traitement a donc été analysé (accumulation et dépuration), en restreignant également l'analyse à deux échantillons parmi les trois prélevés à chaque pas de temps.

Détermination de la concentration en B[a]P dissous

20 mL ont été prélevés dans les béchers des traitements (C, B, M et H) aux temps t=2, 22, 52, 142, 168 h durant la phase d'accumulation et une fois durant la dépuration. Ils ont été rassemblés pour chaque traitement en un unique prélèvement d'eau dans une bouteille de 250 mL en verre.

Les échantillons ont été purifiés et concentrés par extraction sur phase solide sur cartouche (C-18, Chromabond endcapped Macherey-Nagel® 3mL, 500mg) réalisée par un extracteur automatique à six postes (Zymark, Autotrace) en cinq étapes :

1. Conditionnement des cartouches par 6 mL méthanol 6 mL d’eau ultra-pure.
2. Passage des échantillons au flux de 10 mL / minutes
3. Rinçage des cartouches par 6 mL d’eau ultra pure.
4. Séchage des cartouches durant 30 minutes sous flux d’azote N_2.
5. Elution par 6 mL de dichlorométhane.

Une solution étalon de contrôle du rendement de l’extraction a été utilisée pour chacune des six séries (correspondantes aux temps d'échantillonnage) dopée avec 50 µL d'une solution de B[a]P dans l'éthanol (3,2 $mg.L^{-1}$) dans 200 mL d’eau ultrapure. Les éluats de B[a]P ont été stockés à 4°C dans des bouteilles en verre bruns de 10 mL fermées. Après un mois nous avons constaté que le solvant s’était évaporé de la plupart de nos échantillons, suite à quoi le résidu sec a été repris par 2 mL de dichlorométhane et stocké une semaine au

congélateur (-18°C) avant analyse. L'évaporation à sec des échantillons durant leur stockage, accidentelle, est susceptible d'avoir entraîné un surcroît de variabilité dans l'analyse des concentrations en B[a]P dissous. Le rendement de l'extraction établi à partir des étalons de contrôle pour chaque série est de 0,23% ± 0,04%. Les concentrations d'expositions ont été corrigées de ce rendement qui inclut la perte possible de B[a]P lors du passage à sec des échantillons. L'analyse a été réalisée par chromatographie en phase gaz couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) au laboratoire du CEREVE (UMR MA 102, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, France).

II.3.2.2 Résultats et discussion

Les concentrations d'exposition en B[a]P sont présentées Figure 27. Pour les traitements B, M, et H respectivement, elles sont inférieures aux concentrations nominales d'un facteur 2, 4 et 5.

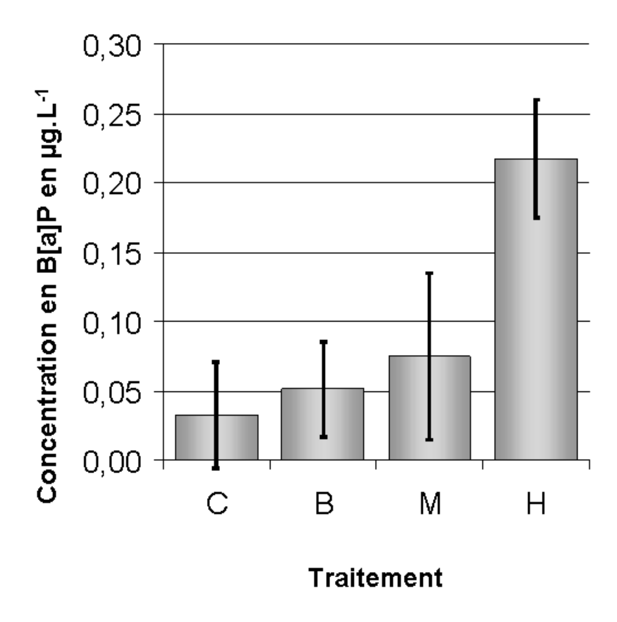


Figure 27 Concentrations moyennes ± E-T (n=4, entre t=2h et 142h) en B[a]P total dans l'eau lors des expositions de *G. pulex.*

Ainsi, seule une fraction du B[a]P nominal de la solution source du système est parvenue aux béchers d'exposition. Deux hypothèses explicatives ont été avancées : la masse manquante de B[a]P aurait été adsorbée sur les parois des conduits (en plastique) ou bien adsorbée en surface des gammares et aurait été perdue lors de leur rinçage.

La teneur en B[a]P des gammares augmente durant les 72 premières heures d'exposition, mais pas entre 72 h et 168 h, cf. Figure 28. L'influx initial de B[a]P dans les gammares est de 0,15 µg.g^{-1}.L^{-1} (influx obtenu comme la pente de la régression linéaire passant par l'origine de l'évolution des teneurs mesurées entre 0 et 48 heures). L'accumulation résultante a présenté une saturation au bout de 72 h.

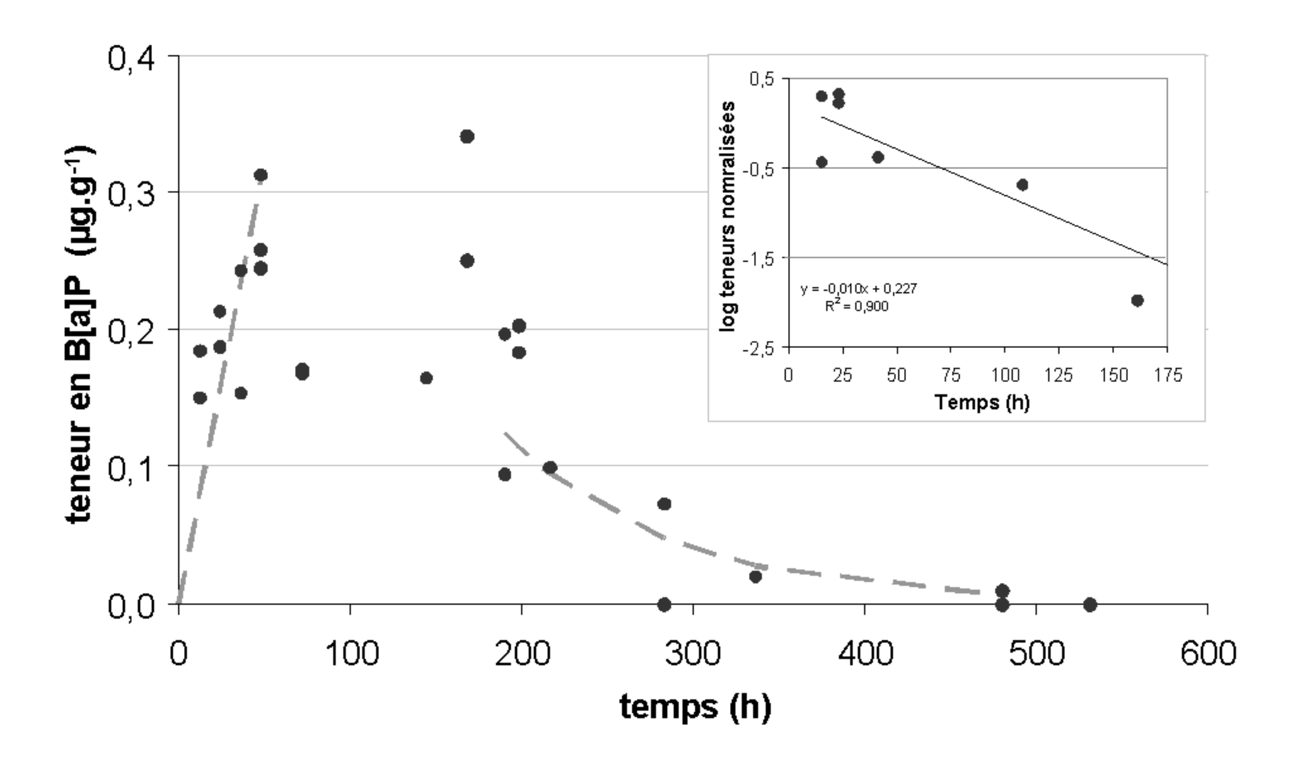


Figure 28 Toxicocinétique du B[a]P chez *G. pulex*. La limite de quantification de la méthode analytique est de 0,03 µg.g^{-1} de B[a]P. La droite partant de l'origine en pointillé a pour pente 0,15 µg.g^{-1}.j^{-1} et correspond à la régression linéaire de l'augmentation des teneurs en B[a]P entre 0 et 48h (quatre premiers temps). La courbe en pointillée décrit le modèle de décroissance exponentielle des teneurs en B[a]P lors de la dépuration, partant de la moyenne des teneurs à *t*=188h et suivant le taux d'élimination obtenu par régression log-linéaire. Figure encadrée en haut à droite : graphique des données et de la droite de régression pour le traitement log-linéaire de la dépuration.

En supposant la concentration totale en B[a]P comme entièrement biodisponible (0,22 µg.L^{-1}), cet influx traduirait un taux d'entrée par voie dissoute du B[a]P de 0,7 L.g^{-1}.j^{-1}. Par comparaison, ce taux d'entrée par voie dissoute du B[a]P chez *G. pulex* est du même ordre de grandeur que celui mesuré par un protocole comparable chez les amphipodes de la famille *Diporeia*, établi à 2,8 ± 0,11 L.g^{-1}.j^{-1} (Landrum, 1988).

Une telle courbe toxico-cinétique d'accumulation ne renseigne pas sur le détail des mécanismes de bioaccumulation du B[a]P, en particulier sur la distinction entre absorption

et adsorption. Néanmoins nous pouvons tenir compte du fait que les gammares ont été soigneusement rincés juste après échantillonnage et qu'il a été montré chez *Daphnia magna* qu'un processus chimique passif, comme l'adsorption en surface de la cuticule des crustacés, n'était responsable que d'une faible partie de la bioaccumulation totale en B[a]P (McCarthy, 1983a). Nous pouvons donc interpréter cette accumulation comme une internalisation du contaminant dans les tissus des gammares.

Durant la phase de dépuration, une rapide décroissance des teneurs en B[a]P a été observée, pour laquelle une régression log-linéaire explique 90% de la variation (R^2=0,90), cf. Figure 28. Le taux d'élimination est de 0,24 j^{-1}. Les pesées des groupes de gammares durant la phase de dépuration indiquent que la dilution biologique n'était pas significativement différente de zéro et est donc négligeable devant 0,24 j^{-1}. Notre étude détermine un taux d'élimination qui n'est pas comparable à celui mesuré chez l'amphipode *Diporeia* (de 0,038 ± 0,026 j^{-1}) par Landrum (1988) et qui correspond à l'élimination à la fois du composé parent et de ses métabolites puisque le B[a]P-^{14}C était suivi (marqué radioactivement).

Nous pensons qu'une métabolisation du B[a]P a causé la dépuration observée. La formation de métabolites du B[a]P chez *Gammarus fossarum* a été démontrée par Richter (2002) en fractionnant par chromatographie liquide haute performance les composés bioaccumulés (par voie dissoute et par voie trophique séparément) suite à une bioaccumulation de B[a]P-^{14}C. Néanmoins, ces composés n'ont pas pu être identifiés.

Enfin, la pertinence d'une interprétation des teneurs en HAP des gammares de terrain par un modèle biodynamique semble plutôt compromise par la métabolisation rapide du B[a]P (et potentiellement des autres HAP). En effet, ce modèle a été construit sur une interprétation des processus de bioaccumulation fort différente du cas rencontré avec le B[a]P, interprétation qui inclut l'entrée par le transport actif cationique, le stockage interne (des métaux) sous forme détoxiquée etc., mais qui n'a encore pas abordé les processus de métabolisation à notre connaissance (puisque cela ne concerne pas les métaux). De plus, la validation et l'intérêt de ce modèle nécessitent que les microcontaminants puissent être mesurés dans les organismes *in situ* dans une large plage de teneurs ce que la rapidité de la dépuration du B[a]P semble compromettre *a priori*.

II.3.3 Conclusion

En conclusion, cette étude a permis une première détermination des paramètres toxico-cinétiques d'entrée et d'élimination (probablement par métabolisation) du B[a]P chez *G. pulex*. Le taux d'entrée par voie dissoute et la rapidité de la dépuration du B[a]P indiquent que le gammare, en tant que moniteur biologique intégratif de la contamination du milieu en HAP, présente un temps d'intégration court. Le potentiel de bioindication de l'exposition en milieu naturel en B[a]P dissous par *G. pulex* semble donc *a priori* faible. Néanmoins la voie trophique n'a pas été étudiée dans cette étude et son importance éventuelle pourrait remettre en cause ce premier avis. Enfin, du fait d'une possible transformation du B[a]P par métabolisation chez les gammares, de l'abondance des gammares dans certains milieux (y compris contaminés en HAP) et de la toxicité connue des métabolites du B[a]P, la participation de ce crustacé au devenir des HAP dans l'environnement aquatique pourrait être importante.

III. L'ASSIMILATION DU CD ET DU CU PAR VOIE TROPHIQUE CHEZ *G. PULEX*

Les métaux sont susceptibles d'être assimilés par voie trophique par les crustacés d'eau douce. Chez *G. pulex,* cette voie de bioaccumulation a été mise en évidence par Abel et Bärlocher (1988). Dans cette étude la nourriture contaminée était un champignon en surface des feuilles en décomposition du milieu aquatique. Les résultats obtenus dans le cadre du stage de master de C. Lacour (2006) ont montré qu'en contaminant des bryophytes aquatiques, on fournissait aux gammares une nourriture qui provoque de la bioaccumulation du Cd. En revanche, il n'existe pas à notre connaissance de quantification de ce phénomène. *G. pulex* (à l'âge adulte) se nourrit en milieu naturel surtout de feuilles en décomposition. Dans le cas où les métaux seraient significativement assimilés par voie trophique chez cet amphipode, il intègrerait une contamination du milieu différente de celle de l'eau, des algues ou des matières en suspension. A ce titre, il est donc intéressant de quantifier ce phénomène et d'en étudier ensuite l'importance par rapport à la voie dissoute, en relation avec les niveaux de contamination du milieu aquatique (les teneurs dans l'eau et dans les feuilles). Après avoir étudié les facteurs de contrôles de la bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez *G. pulex*, nous avons voulu quantifier les apports par voie trophique et en déterminer l'importance relativement à la voie dissoute.

Dans le cadre du modèle biodynamique, la quantification des apports par voie trophique repose sur la mesure de l'efficacité d'assimilation du métal étudié (AE, assimilation efficiency en anglais), mesure qui permet d'analyser l'apport par voie trophique en relation avec la contamination de la nourriture et du taux d'ingestion (IR). L'AE est la proportion (en %) de métal présent dans la nourriture qui traverse la paroi digestive lors de l'ingestion d'un bol alimentaire contaminé (Wang et Fisher, 1999). Mesurer ce paramètre nécessite d'utiliser des traceurs métalliques, qui peuvent être soit des isotopes radioactifs, soit des isotopes stables des métaux en abondance naturelle minoritaire. Les inconvénients et avantages de ces deux approches ont été décrits par Croteau et al. (2004). Les isotopes radioactifs du Cu ayant des demi-vies courtes (12h), ils sont mal adaptés à un usage comme traceurs pour des expériences de biologie durant quelques jours (la correction à faire concernant leur désintégration entraîne une forte erreur sur les mesures). L'intérêt de développer des approches expérimentales par isotopes stables est donc d'autant plus important

pour ce métal. Ainsi, le Cd, dans la continuité des travaux antérieurs, et le Cu ont été sélectionnés pour cette étude où, sur un plan méthodologique, nous avons adapté à *G. pulex* le protocole de mesure de l'AE utilisant des isotopes stables développé avec un gastéropode par Croteau et al. (2007a).

III.1 MATERIEL ET METHODES

III.1.1 Principe de l'expérience

L'expérience consiste à suivre le passage d'une contamination alimentaire ponctuelle, méthode du "pulse-chase feeding", adaptée de précédents travaux (Calow et Fletcher, 1972; Croteau et al., 2007a). Ainsi, des gammares se nourrissent de feuilles d'aulnes contaminées avec des isotopes stables des métaux durant une phase d'exposition. S'ensuit une phase de « chasse » ou de défécation, durant laquelle ils sont nourris avec des feuilles non-contaminées. Les traceurs métalliques des feuilles contaminées consommées en phase d'exposition se retrouvent pour partie internalisés dans les gammares, et pour partie dans les fèces, aux fuites possibles près dans l'eau (par désorption des feuilles et des fèces ou par excrétion liquide des gammares). Les traceurs consommés (en entrée), internalisés par les organismes et déféqués (en sortie) sont analysés, cf. Figure 29.

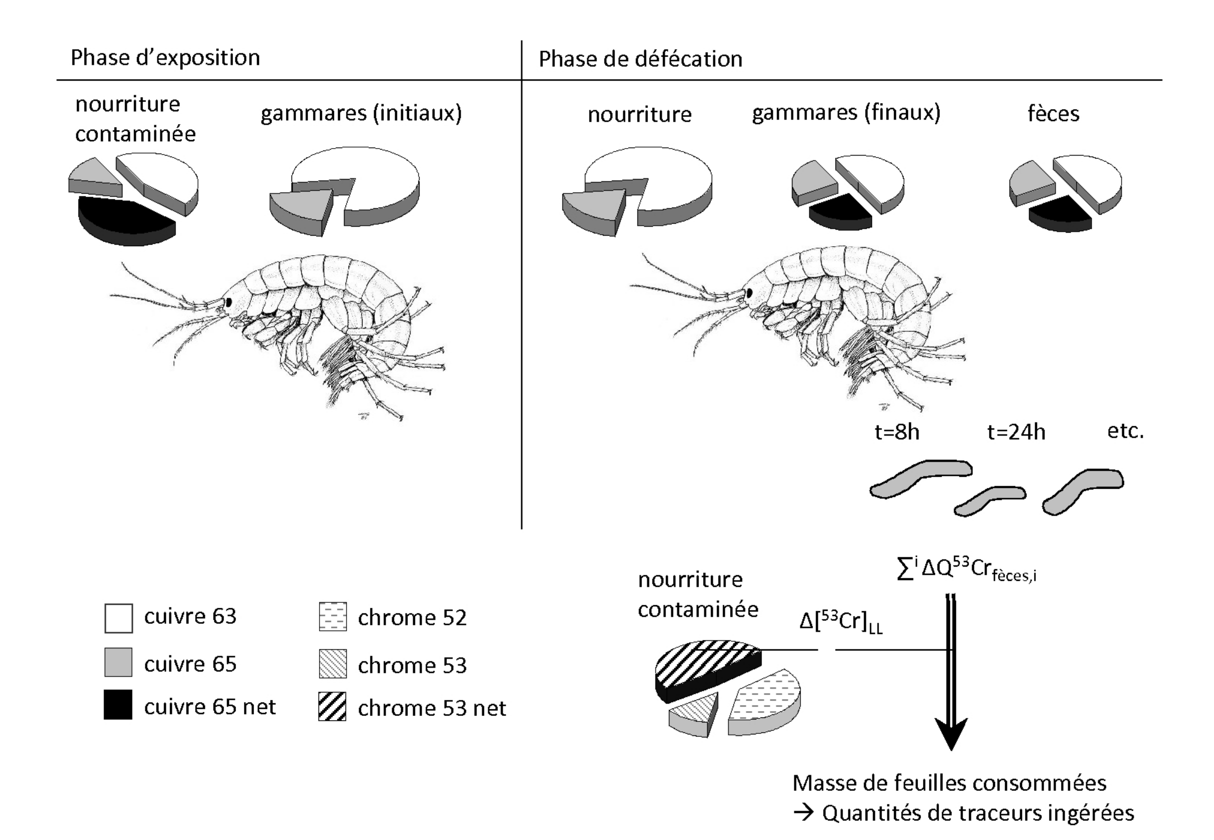


Figure 29 Schéma du principe de l'expérience de pulse-chase feeding en utilisant comme traceur des isotopes stables des métaux (par exemple, ^{65}Cu et ^{53}Cr). Les gammares initiaux contiennent une quantité de ^{65}Cu nette nulle et une quantité du même isotope dans les proportions naturelles qui est liée à la présence de l'élément cuivre. Le ^{53}Cr a servi de traceur inerte de la digestion, il n'est pas assimilé par les gammares. La flèche horizontale indique que la masse de feuilles consommée (en g) est déduite de la somme des quantités nettes de ^{53}Cr dans les fèces récupérées lors de la phase de défécation (notée $\Sigma\ \Delta Q^{53}Cr_{fèces}$, cf. texte) et de la teneur en ^{53}Cr des feuilles contaminées consommées en phase d'exposition, notée $\Delta Q(^{53}Cr)_{LL}$. La quantité de ^{65}Cu ingérée est déduite de la masse de feuilles consommées et des teneurs de celles-ci en traceur, cf. méthode du bilan de masse.

Nous avons utilisé des isotopes stables des métaux, en abondance naturelle minoritaire, afin de pouvoir discriminer les quantités nettes d'isotopes stables des métaux présentes du fait de l'exposition provoquée, de celles présentes initialement dans les fèces et les gammares. Le ^{65}Cu (abondance naturelle 31%), le ^{53}Cr (9,5%) et le ^{106}Cd (1,25%) ont été utilisés. La digestion étant un processus qui ne conserve pas la masse de matériel ingéré, il est nécessaire de se rapporter à un traceur spécifique, supposé non-assimilé par les organismes, pour mener les comparaisons en teneurs et en ratios isotopiques entre l'alimentation et les fèces. Il s'agit ici du ^{53}Cr, non-assimilé par la plupart des invertébrés aquatiques (Wang et Fisher, 1999).

III.1.2 Dopage en isotopes stables des feuilles d'aulne

Une vingtaine de disques de feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) de 2 cm de diamètre a été contaminée en surface en ^{53}Cr, ^{65}Cu et en ^{106}Cd par un protocole chimique. Les solutions mères utilisées pour ce dopage ont été préparées par diverses attaques acides de poudre d'oxyde de ces isotopes, de puretés isotopiques supérieures à 90% (Eurisotope, Saclay, France). Les feuilles ont été trempées dans une solution à 413 $µg.L^{-1}$ de ^{53}Cr, 390 $µg.L^{-1}$ de ^{65}Cu et 793 $µg.L^{-1}$ de ^{106}Cd, initialement à pH acide. Une remontée de pH vers pH 10, par ajouts de soude, a provoqué une adsorption des isotopes sur les feuilles (et sur les parois du bécher). Les disques ont été ensuite rincés durant soixante-douze heures, dans un bain de 3 L d'eau minérale constamment agité, afin qu'ils perdent la majeure partie de la fraction rapidement désorbable des traceurs.

III.1.3 Conditions expérimentales

Lors de l'expérience de « pulse-chase » feeding, huit réplicats expérimentaux et deux témoins négatifs ont été réalisés en parallèle. Dans chaque bécher, sept gammares se sont nourris de disques de feuilles d'aulne contaminées durant 7,5 heures (phase d'exposition), puis de disques non-contaminés durant 168h, (phase de défécation). L'exposition doit en principe durer moins que la durée minimale de transit intestinal afin d'éviter toute réingestion de traceur déféqué. Nous avons estimé ce temps à 16 h en prenant en compte un temps de rétention digestive des gammares de 72 h, estimé par Felten (2003), et un ratio entre le temps de digestion et celui de sortie des premières fèces contaminées de 4,5, celui d'un gastéropode étudié par Croteau et al. (2007a).

Sur le modèle de Werner (2000), l'architecture des aquariums à deux étages séparés par un tamis de 0,5 mm a permis la collecte des fèces de gammares, cf. Figure 30. La sédimentation des fèces dans le compartiment inférieur de cet aquarium les isole des gammares. Les fèces ont été prélevées à la pipette puis déposées sur un filtre en polycarbonate de 25 mm, étape durant laquelle l'eau liée aux fèces a été en grande partie extraite de ces échantillons, le filtre étant installé sur un support rattaché à une fiole à vide. L'eau des béchers (600 mL) a été renouvelée en début de phase de défécation et une fois au cours de celle-ci. Les fèces

ont été récoltées aux temps t= 8,4 – 23,4 – 34,4 – 49,9 – 73,9 – 99,9 et 168,4 h à partir du début de l'expérience. La fraction dissoute de l'eau a été échantillonnée par filtration seringue à 0,45 µm (Whatman filtre polyestersulfone) en début et fin de phase d'exposition puis à fréquence quotidienne durant la défécation. Les gammares en fin d'expérience ont été sacrifiés afin d'analyser les métaux bioaccumulés.

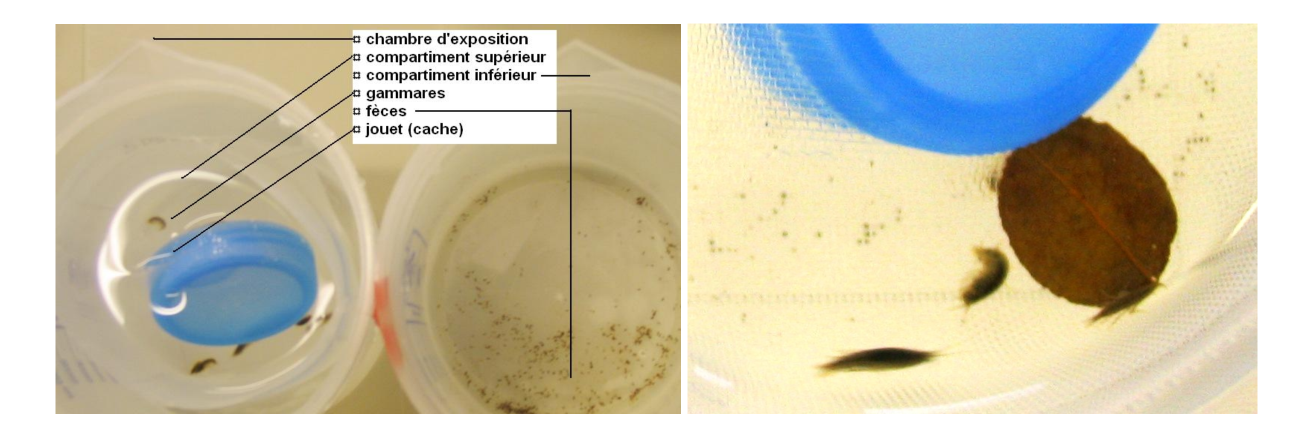


Figure 30 Photos d'une chambre d'exposition vue de dessus. Le compartiment supérieur a été placé dans un second bécher pour visualiser les fèces dans le fond de la chambre d'exposition. A droite, nutrition des gammares sur un disque de feuille et défécation dans le compartiment inférieur.

III.1.4 Préparation des échantillons

Les vaisselles non-consommables utilisées étaient en polypropylène ou en téflon et ont systématiquement été nettoyées à l'acide nitrique 1% puis rincées à l'eau ultrapure avant utilisation. Les échantillons d'eau ont été acidifiés à 2% à l'acide nitrique ultrapur. Les fèces recueillies sur filtre ont été séchées 24 h à l'étuve à 45°C (dans des boites de pétri fermées) puis pesées avec une précision de l'ordre de 0,01 g. Les restes non-consommés de disques de feuilles contaminées et de feuilles non-contaminées, les fèces ainsi que les gammares ont été séchés, pesés poids sec et minéralisés par ajouts d'acide nitrique (au moins 50 µL par mg sec de matériel organique) et de peroxyde d'hydrogène (au moins 20 µL idem) de puretés adaptées à l'analyse des métaux traces. La minéralisation a été complétée par une évaporation à sec des minéralisats, menée avec une DIGIPREP (90 °C, 200 minutes). Les résidus secs ont été repris dans un volume de 5 mL d'acide nitrique 2% ultra pur. Le coefficient de minéralisation est le rapport de la masse d'échantillon solide minéralisé sur le volume final des échantillons.

III.1.5 Analyse

Les isotopes du Cr (de masse atomique 50, 52 et 53), du Cd (106 et 114) et du Cu (65 et 63) et du Ge (72 et 74) ont été analysés en spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS, CCT-X Series, ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France) au Laboratoire des Sciences du Climat et l'Environnement. En plus des isotopes mentionnés, les isotopes (^{54}Cr, ^{108}Cd, ^{110}Cd, ^{111}Cd, ^{112}Cd, ^{113}Cd, ^{116}Cd) ont été mesurés dans les solutions de la gamme d'étalonnage de l'ICP-MS, en vue de mesurer les abondances isotopiques relatives des traceurs utilisés. Aucun calcul de correction automatique d'interférences n'a été pris en compte. La mesure des isotopes du Cr en ICP-MS étant sujette à des interférences dans les matrices organiques, nous avons utilisé une cellule à collision (CCT), comme recommandé par Hammer et al. (2005). Les échantillons ont été analysés avec et sans CCT et les résultats obtenus sur les matériaux de référence ont été comparés.

Du germanium élémentaire (10 ou 5 ppb) a été ajouté dans les échantillons comme étalon interne servant à s'affranchir d'éventuelles variations de sensibilité de l'ICP-MS. Les limites de détection (LD) de cette méthode dans la matrice eau acidifiée par HNO_3 à 2% sont indiquées dans le Tableau 6. La LD a été calculée comme trois fois l'écart type autour de la concentration mesurée du blanc analytique.

Isotope	LD en ng.L^{-1}
^{50}Cr	10
^{52}Cr	12
^{53}Cr	10
^{63}Cu	10
^{65}Cu	10
^{106}Cd	25
^{114}Cd	1

Tableau 6 Limites de détection pour les isotopes analysés

Le spectromètre de masse mesure une intensité en nombre de coups pour une durée d'intégration fixée, notée $\chi^{i}_{matrice}$ où i spécifie la masse atomique de l'isotope mesuré dans un échantillon de matrice indicée. Nous appelons par la suite abondance isotopique relative

du traceur i, notée p^i, le rapport entre l'intensité d'un isotope (i=65, 53 ou 106) et la somme des intensités de tous les isotopes du même élément, mesurées dans les solutions étalons de l'ICP-MS. Avec CTT, p^{53} est de 8,3 %, p^{65} = 33 % et p^{106}= 1,1 %.

Les concentrations élémentaires, notées $[T^iE]$ où E est un métal (Cd, Cu ou Cr), sont calculées à partir de chaque intensité isotopique, moyennant p^i, après prise en compte des volumes de dilution et correction de la concentration en standard interne. On obtient ainsi autant de concentrations élémentaires que d'isotopes de l'élément. Lorsque la concentration élémentaire déduite à partir d'un isotope traceur est largement surestimée, cela traduit la présence en isotope stable surajouté. Ainsi, il existe une concentration nette de traceur dans l'échantillon, en surplus par rapport à la présence « naturelle » de l'isotope (i.e. due à la présence de l'élément dans ces échantillons). Cette concentration nette d'isotope est notée $\Delta[^iE]$(µg.L^{-1}) et se calcule selon l'Équation 16, où est retranchée à la concentration isotopique intégrale de l'échantillon (p^i . $[T^iE]$), la concentration du même isotope ^iE due à la présence de l'élément dans l'échantillon (et non à la contamination en traceur), qui est calculée comme le produit de p^i par la concentration élémentaire $[T^kE]$.

Équation 16

$$\Delta[^iE] = p^i . ([T^iE] - [T^kE])$$

On choisit k afin que ^kE soit l'isotope le plus abondant de l'élément : le ^{114}Cd a été utilisé pour calculer la quantité nette de ^{106}Cd, le ^{63}Cu pour celle de ^{65}Cu et le ^{52}Cr pour celle de ^{53}Cr. Cette méthode suppose que la composition en autres isotopes du Cu, Cr et Cd que ceux utilisés pour le traçage de la digestion n'a pas été modifiée au cours de l'expérience. Les quantités de traceurs (totales ou nettes, exprimées en ng) ont été calculées en multipliant les concentrations (totales ou nettes) par les coefficients de minéralisation des échantillons (en mL par mg poids sec). La qualité de la préparation des échantillons et de l'analyse a été contrôlée en utilisant deux matériaux de référence certifiés : l'eau de rivière SRM 1640 (NIST, Gaithersburg, Maryland USA) et le tissu de moule ERM-CE 278 (IRMM, Brussel, Belgique).

III.1.6 Cadre d'interprétation

En vue de déterminer les efficacités d'assimilation des métaux, deux méthodes d'interprétation des analyses ont été suivies : celle dite « des ratios » et celle du bilan de masse. Le principe de la méthode des ratios est de mesurer l'appauvrissement en traceur dans les fèces par rapport à la nourriture, en normalisant la teneur en traceur dans ces matrices par celle en traceur inerte. Cette normalisation permet de mener le calcul à partir des intensités ICP-MS, directement, et non des teneurs (en $\mu g.g^{-1}$) dans les feuilles et fèces, car le coefficient de minéralisation d'un échantillon de feuilles ou de fèces est le même quelque soit l'isotope. Ainsi, l'efficacité d'assimilation a été calculée, par la méthode des ratios, suivant la formule de l'Équation 17 :

Équation 17

$$AE = 1 - \frac{\dfrac{\chi^{65}_{fèces}}{\chi^{53}_{fèces}}}{\dfrac{\chi^{65}_{feuilles}}{\chi^{53}_{feuilles}}}$$

où $\chi^{i}_{matrice}$ est l'intensité ICP-MS, en nombre de coups, à la masse i dans un échantillon de matrice spécifiée en indice, fèces ou feuilles contaminées. Sous l'hypothèse que les trois traceurs aient été excrétés suivant une même cinétique de défécation, la méthode des ratios n'impose pas de récupérer intégralement les traceurs ingérés (Calow et Fletcher, 1972) et il est possible de mener le calcul avec les signaux sommés d'une partie des échantillons des fèces. C'est ce qui a été fait : seules les fèces du premier prélèvement ont été sélectionnées.

La méthode du bilan de masse consiste à comparer les quantités nettes de traceurs en entrée et en sortie du système, le système étant composé des feuilles contaminées ingérées, des gammares, de l'ensemble de leurs fèces. Le cumul des quantités nettes de traceur dans les fèces prélevées dans la semaine suivant l'exposition est notée $\Sigma\, \Delta Q^{i}E_{fèces}$ (ng) et celle en traceur internalisé en fin d'expérience (par les groupes de gammares de chaque traitement) est notée $\Delta Q^{i}E_{org}$ (ng). La quantité nette de traceur entrante nécessite de connaître avec précision la masse de feuilles contaminées ayant été ingérée par les groupes de gammares durant la phase d'exposition. Cette masse (en g) a été déduite de $\Sigma\, \Delta Q^{53}Cr_{fèces}$ et de la concentration nette en ^{53}Cr des feuilles contaminées. Les quantités de ^{106}Cd et ^{65}Cu ingérées,

notées $\Delta Q^{i}E_{LL}$ (ng), ont été déduites des masses de feuilles ingérées dans chaque traitement et des concentrations nettes en traceur des feuilles. Enfin, la quantité de traceur ayant fuit vers l'eau au cours de la phase d'exposition a été déduite de la variation des $\Delta[^{i}E]$ des prélèvements d'eau entre le début et la fin de cette phase ($\Delta Q^{i}E_{eau}$, en ng). En l'absence de fuite dans l'eau, la quantité de traceur $\Delta Q^{i}E_{LL}$ entre dans le système digestif des gammares, et les quantités $\Delta Q^{i}E_{org}$ et $\Sigma\ \Delta Q^{53}Cr_{fèces}$ en sortent. L'efficacité d'assimilation d'un traceur peut donc être calculée comme la proportion de traceur entrante internalisée par les gammares (Équation 18) :

Équation 18

$$AE(^{i}E) = \frac{\Delta Q^{i}E_{org}}{\Delta Q^{i}E_{LL}}$$

III.2 Resultats et discussion

III.2.1 Utilité de la cellule à collision (CCT)

La Figure 31 présente les résultats des analyses ICP-MS, avec ou sans CCT, de deux réplicats du matériau de référence (tissu de moule). Le taux de recouvrement est le rapport entre la teneur mesurée et la teneur théorique de référence de chaque élément, exprimée pour chaque isotope en pourcentage. Cu et Cd furent mesurés convenablement avec ou sans CCT. Les taux de recouvrement en ^{65}Cu, ^{63}Cu, ^{106}Cd et ^{114}Cd montrent la conformité des analyses avec les valeurs certifiées. En revanche, pour l'élément Cr, la CCT modifie le profil isotopique des mesures. Le chrome a été analysé avec un taux de recouvrement égal quelque soit l'isotope utilisant la CCT, alors que ce n'est pas le cas sans la CCT. De plus, sans CCT, les mesures n'ont pas été répétables en ^{53}Cr.

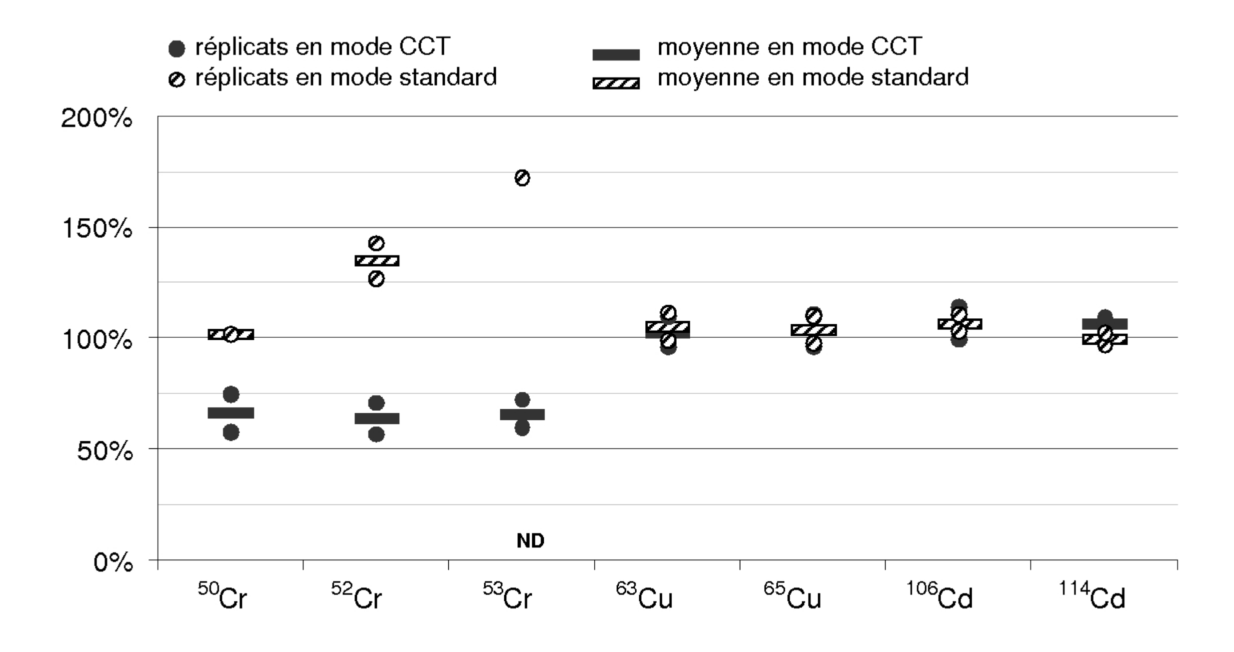


Figure 31 Taux de recouvrement pour chaque isotope de la teneur élémentaire certifiée, avec ou sans CCT, dans les échantillons de tissus de moule ERM 278. Les barres centrales représentent les moyennes des deux duplicatas A et B. Abréviation : ND, non determiné.

Les variations du taux de recouvrement entre isotopes du chrome quand il est analysé sans CCT ont été interprétées comme une conséquence des interférences. La formation d'ions polyatomiques est connue pour interférer avec la mesure de certains isotopes, ainsi l'ion[13] $(^{12}C+^{40}Ag)^{2+}$ interfère avec la mesure du ^{52}Cr, $(^{13}C+^{40}Ag)^{2+}$ avec celle de ^{53}Cr (Dufailly et al., 2006). Avec CCT, les taux de recouvrement des isotopes du chrome sont similaires, avec une sous-estimation de 36% par rapport à la teneur certifiée du matériau de référence en Cr. Ceci peut être expliqué par les différences entre le protocole d'analyse de cette étude et celui utilisé pour obtenir la teneur certifiée (Lamberty et Muntau, 2005) :

- La teneur certifiée en métaux a été calculée sur une moyenne incluant des résultats d'analyse par la méthode de l'activation neutronique. Et celle-ci mesure une valeur systématiquement supérieure aux méthodes spectrométriques, les justesses[14] respectives de ces méthodes étant comparables (Lamberty et Muntau, 2005).

---

[13] L'argon (Ag) est le gaz vecteur du procédé utilisé par l'ICP-MS.

[14] accord entre la valeur mesurée et la valeur conventionnellement admise

- des minéralisations, à chaud et sous pression, plus poussées que celle utilisée dans cette expérience ont été utilisées pour la certification du matériau de référence.

Ces résultats montrent que l'utilisation d'une CCT est adaptée à la mesure de traces isotopiques dans les matrices organiques et qu'elle a permis une réduction des interférences entachant la mesure des isotopes du Cr, ce qui est crucial dans notre méthodologie. Dans la suite, les résultats sont issus de mesures utilisant la CCT sans correction sur les concentrations mesurées des isotopes du chrome. Il a été vérifié que les calculs des bilans de masse et des efficacités d'assimilation étaient inchangés si un facteur correctif de +36% était appliqué aux concentrations en chrome mesurées.

III.2.2 Contamination des matrices

Les concentrations en ^{53}Cr, ^{65}Cu et ^{106}Cd dans l'eau ont été respectivement de 1,5 ± 1,0, 275 ± 123 et 2,3 ± 1 $ng.L^{-1}$ en début de phase d'exposition. Elles ont atteint les valeurs 1,1 ± 2,0, 352 ± 114 et 13 ± 4 $ng.L^{-1}$ en fin de cette phase. Seule la variation de concentration de 11 $ng.L^{-1}$ en ^{106}Cd est significative (t-test p=1,7.10^{-4}, n=8). Elle a pu provenir d'un lessivage des fèces ou bien des feuilles contaminées. Nous avons calculé à partir du taux d'entrée par voie dissoute en Cd de *G. pulex* (Pellet et al., 2008) que cette contamination de l'eau n'était susceptible d'induire qu'une bioaccumulation inférieure ou égale à 60 pg de ^{106}Cd par réplicat. Cette quantité nette de ^{106}Cd est 50 fois inférieure à celle accumulée en ^{106}Cd en fin d'expérience, de sorte que l'on peut considérer que les gammares n'ont été contaminés que par voie trophique lors de l'expérience.

Les feuilles consommées par les gammares ont été contaminées en ^{53}Cr, ^{65}Cu et en ^{106}Cd avec des facteurs de contamination par rapport aux feuilles non-contaminées respectivement de : 120 - 4,7 et 2915, cf. Figure 32.

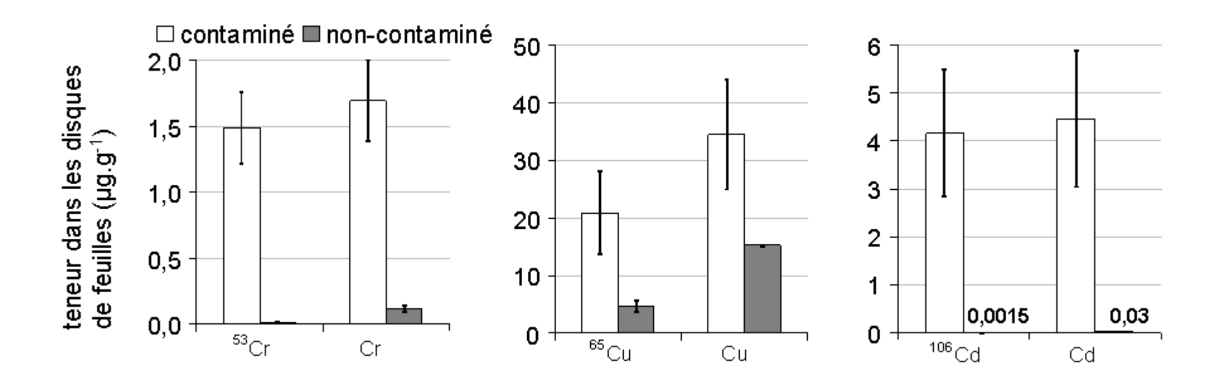


Figure 32 Contaminations moyennes en ^{53}Cr, ^{65}Cu et ^{106}Cd et en Cr, Cu et Cd de la nourriture des gammares durant l'expérience. En ordonnées : teneur en isotopes ou en éléments en µg.g^{-1}. Moyenne ± E-T (*n*=8 pour non-contaminé, *n*=7 pour contaminé). La teneur en ^{53}Cr n'est pas quantifiée, les valeurs étant sous la LD.

Les gammares ont été contaminés significativement en ^{106}Cd et en ^{65}Cu mais non en ^{53}Cr en fin d'expérience, cf. Tableau 7. Or, les feuilles consommées étaient bien contaminées en ^{53}Cr. Nous vérifions donc a posteriori que Cr est un bon traceur inerte de la digestion, c'est-à-dire qu'il n'a pas été assimilé par les gammares.

		Δ[^{53}Cr]	n=	Δ[^{65}Cu]	n=	Δ[^{106}Cd]	n=
Gammares	contrôle	<LD	2	0,100	2	<LD	1
		<LD	8	0,370 ±0,10	8	0,055 ±0,027	8
Fèces	contrôle	0,010	2	0,080	2	<LD	2
(à t = 8,4h)		2,3 ± 0,3	8	52,0 ± 12,3	8	3,1 ± 1,2	8

Tableau 7 Teneurs (µg.g^{-1}) en traceur (^{53}Cr, ^{65}Cu, et ^{106}Cd) dans les gammares en fin d'expérience et les premières fèces contaminées à t = 8,4h.

Les fèces ont été contaminées en ^{53}Cr, ^{65}Cu et en ^{106}Cd durant les vingt-quatre premières heures de défécation et cette contamination a fortement décru entre t = 8,4 et t = 23,4 h, cf. Figure 33. Une teneur résiduelle en traceurs persiste jusqu'à t = 48 h en ^{53}Cr et en ^{106}Cd (entre 0,4% et 2% du total déféqué).

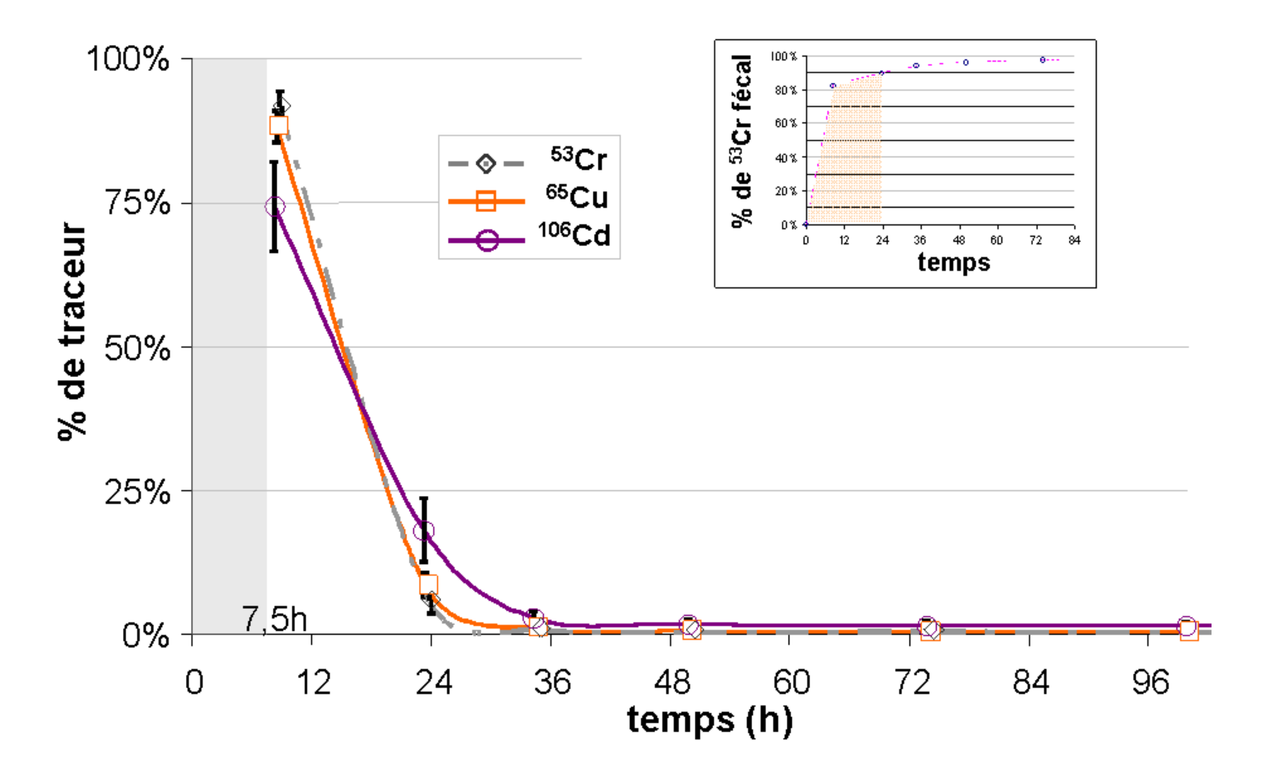


Figure 33 Cinétique d'excrétion des traceurs. Encadré : cinétique de sortie du ^{53}Cr et calcul du temps de rétention digestive (à partir du début de l'expérience) ; la zone colorée représente la durée avant que 90% du ^{53}Cr soit déféqué.

A partir de la cinétique de sortie du ^{53}Cr, le temps de rétention digestive est égal à vingt-quatre heures (temps mis par les invertébrés pour déféquer 90% du traceur inerte de digestion, valeur obtenue sans calcul, le cumul à t = 23,4 h représentant 88,3% de la quantité de chrome total déféquée). Le temps de transit intestinal, c'est-à-dire le temps de la première défécation de fèces contaminées suite à l'ingestion de feuilles contaminées peut donc être estimé à 5,3 heures, en considérant un rapport 4,5 entre ce temps et celui de la rétention digestive, rapport proposé par Croteau et al. (2007a). Ce temps est trois fois inférieur à celui pris en compte initialement pour dimensionner la durée d'exposition. De ce fait, la fréquence d'échantillonnage en début d'expérience n'a pas été optimale. La contamination de la toute première série de fèces 2 h après la fin de l'exposition a montré que l'essentiel de la défécation s'est déroulée au cours des huits premières heures de l'expérience et que la durée minimale de transit intestinal a été inférieure à la durée de la phase d'exposition. Néanmoins, il est improbable que les fèces contaminées aient été ingérées de nouveau du fait de l'architecture à double fond des chambres de défécation.

III.2.3 Nutrition des gammares

Puisque ^{53}Cr a bien été un traceur inerte de la digestion, la masse de feuilles consommée par les gammares de chaque réplicat a été calculée en rapportant la quantité nette de ^{53}Cr déféquée à la contamination des feuilles contaminées. En moyenne, 9 ± 2,3 mg de feuilles (en poids sec) ont été consommés durant la phase de contamination. Cette consommation correspond à un taux de nutrition de 0,69 ± 0,21 $mg.mg^{-1}.j^{-1}$, entre deux et quatre fois supérieur à celui mesuré chez *G. pulex* par Felten (2003). Ceci s'explique du fait que cette consommation a été mesurée durant les toutes premières heures de présence de nourriture, après une période de diète complète de trois jours.

Nous avons observé environ une dizaine d'ingestion d'exuvies de mue lors de l'expérience (7 jours). Cet apport nutritif, différent de celui des disques de feuille, est potentiellement source d'une perturbation du cycle des traceurs prévu par le protocole car les exuvies peuvent contenir des traceurs (Keteles et Fleeger, 2001). En tenant compte du poids moyen d'une exuvie de mue de gammares de 2,5 mg et de la teneur finale en traceurs dans les gammares (cf. Tableau 7), l'ingestion d'une exuvie apporte environ 1 ng de ^{65}Cu et 0,14 ng de ^{106}Cd, ce qui est deux ordres de grandeur inférieur à la masse de traceur apportée par l'ingestion des feuilles contaminées. Cette perturbation peut donc être négligée dans les calculs du bilan de masse.

III.2.4 Efficacité d'assimilation par la méthode des ratios

Le calcul de AE par la méthode des ratios repose sur une comparaison des ratios en ^{65}Cu:^{53}Cr et en ^{106}Cd:^{53}Cr dans les feuilles et les fèces. Comme seule la première série d'échantillons de fèces présentait des intensités ICP-MS en ^{53}Cr supérieure à deux fois celle des contrôles, les calculs ont été effectués en ne prenant en compte que cette série. Le nombre de coups ICP-MS générés par la seule présence des réactifs et du filtre polycarbonate dans les échantillons a été retranché aux signaux des traceurs dans les fèces, considérant que c'est un niveau de blanc dans cette matrice. La Figure 34 présente les résultats obtenus. L'efficacité d'assimilation moyenne du Cd est de 39 % ± 23 % (n=8). Notons que l'appauvrissement en ratio ^{106}Cd:^{56}Cr des fèces par rapport aux feuilles est mesurable dans

les fèces des gammares des traitements contrôles nourris de feuilles non contaminées ce qui permet, en théorie, d'estimer une AE à partir de ces expériences. Cependant, ces AE n'ont pas été prises en compte dans la moyenne indiquée.

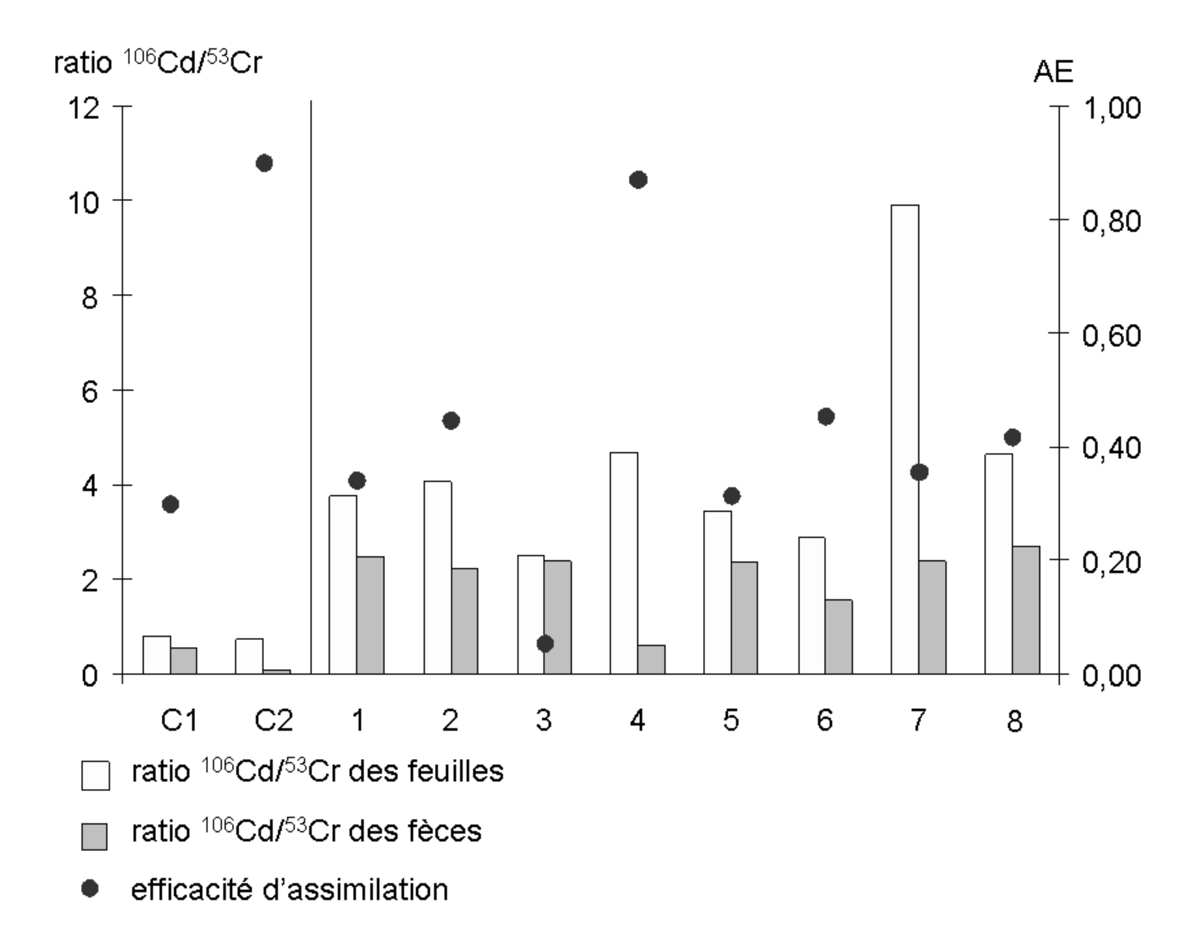


Figure 34 Efficacités d'assimilation du Cd calculées par la méthode des ratios dans les traitements expérimentaux (numérotés de 1 à 8) et dans les contrôles (C1 et C2). Histogramme : ratio entre les signaux du ^{106}Cd et du traceur inerte de la digestion (^{53}Cr), dans les feuilles et les fèces. Point : efficacité d'assimilation correspondante à l'appauvrissement constaté des ratios (échelle de gauche).

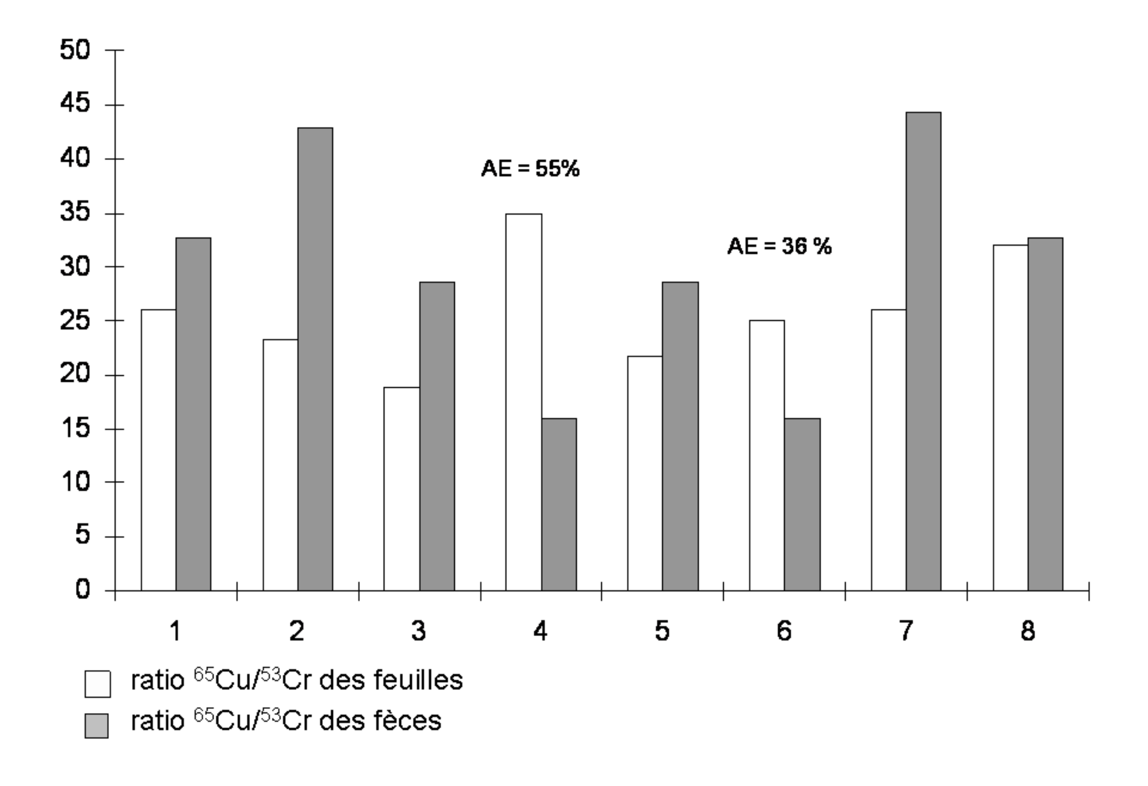


Figure 35 Ratios en traceur cuivre par rapport au traceur inerte dans les feuilles contaminées et les fèces pour les traitements expérimentaux (numérotés de 1 à 8). Les traitements contrôles ne sont pas représentés sur le graphique car les valeurs sont d'un autre ordre de grandeur que celles des traitements : par exemple le ratio en $^{65}Cu:^{53}Cr$ de l'un des deux traitements contrôles est de 598 dans les feuilles non-contaminées et de 1021 dans les fèces. Pour deux traitements, l'efficacité d'assimilation (AE) correspondante à l'appauvrissement constaté est calculable.

Pour le cuivre, le ratio en $^{65}Cu:^{53}Cr$ dans les fèces est supérieur à celui des feuilles contaminées consommées, sauf pour deux traitements cf. Figure 35. Pour autant, le ratio moyen $^{65}Cu:^{53}Cr$ des fèces a été de 30 ± 11, c'est à dire non statistiquement différent de celui des feuilles de 26 ± 6 (W=28, p=0.72). Ainsi, l'enrichissement des fèces en ^{65}Cu par rapport au ^{53}Cr n'a été qu'apparent, dû au bruit autour de la mesure du ^{65}Cu des fèces et des feuilles. Le calcul de l'efficacité d'assimilation du cuivre par cette méthode n'est donc pas possible.

III.2.5 Méthode du bilan de masse

Les résultats des décomptes de traceurs en entrée et sortie du système constitué par les gammares, leur nourriture et leurs fèces sont présentés Figure 36.

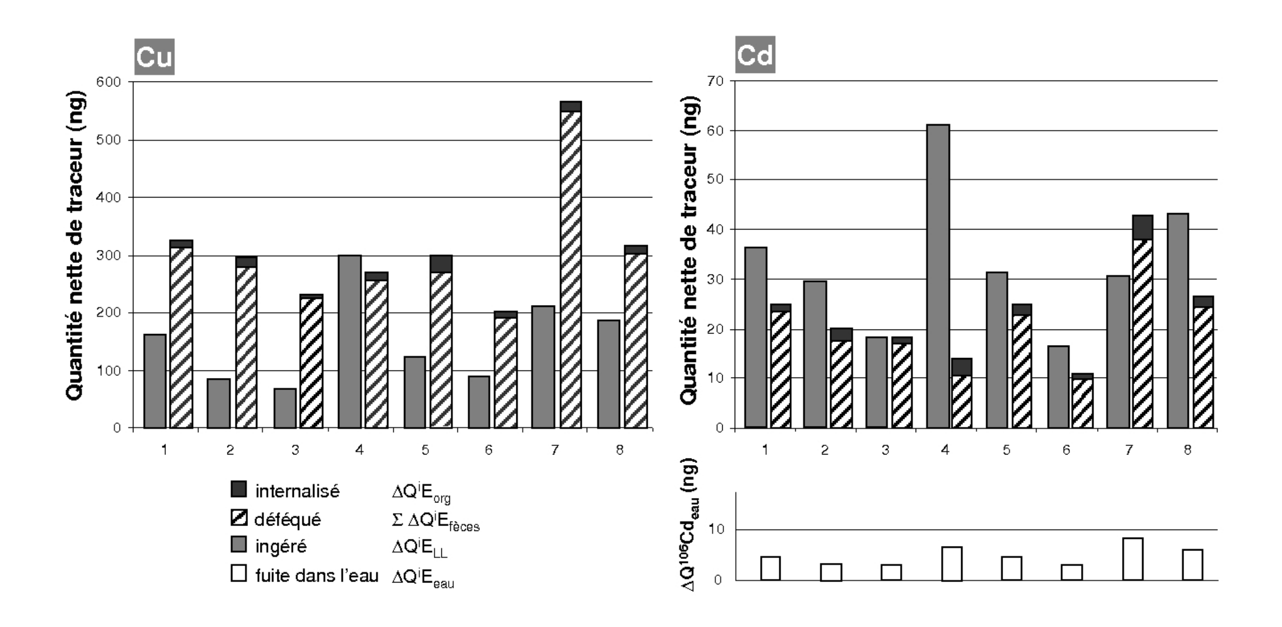


Figure 36 Bilan de masse en vue du calcul de l'efficacité d'assimilation du Cu (gauche) et du Cd (droite). Le bilan de masse est vérifié lorsque les barres de gauche (grise) et de droite (cumul des quantités nettes de traceurs internalisées et déféquées) sont égales. Pour le Cd, la quantité de traceur ayant fuit dans l'eau lors de la phase d'exposition est indiquée sur l'histogramme du bas, à l'échelle du graphique juste au-dessus.

Les quantités de ^{65}Cu en sortie sont supérieures aux quantités entrantes, de plus de 60%, et les quantités de ^{65}Cu déféquées seules sont supérieures à celles calculées comme ingérées, cf. Figure 36. Par conséquent, on ne peut pas calculer d'AE du Cu sur la base de ces décomptes. À l'inverse pour le ^{106}Cd, les quantités de traceur entrantes sont supérieures (en moyenne de 26%) à celle sortantes. De plus, en moyenne sur les huit traitements toujours, cette différence est significative, le rapport moyen entre les quantités de ^{106}Cd en sortie et en entrée (c'est-à-dire la somme de $\Sigma\ \Delta Q^{106}Cd_{fèces}$ et de $\Delta Q^{106}Cd_{org}$, divisée par $\Delta Q^{106}Cd_{LL}$) étant statistiquement inférieure à 100% (Mann-Withney, $U=64$, $p<0,001$).

L'origine des fuites en ^{106}Cd dans l'eau durant la phase d'exposition n'est pas directement identifiable comme étant due au lessivage des feuilles ou à celui des fèces car, d'une part les teneurs en traceurs des feuilles n'ont pas été mesurées avant et après la phase d'exposition, d'autre part des fèces contaminées en traceur étaient présentes dès la phase d'exposition et ont donc pu être source de contamination de l'eau, au même titre que les feuilles. De manière statistique, ces quantités ne sont ni corrélées aux teneurs en ^{106}Cd des feuilles (coefficient de corrélation R^2 de 0,3), ni à celles des fèces (R^2 de 0,4), ni même à la différence entre entrée et sorties du bilan de ^{106}Cd (R^2 de 0,01). La méthode du bilan de masse n'a donc pas pu être corrigée en tenant compte des quantités de Cd ayant fuit durant la phase

d'exposition. Par conséquent, selon que l'on considère le ^{106}Cd internalisé ou déféqué pour calculer des AE, ces dernières sont significativement inégales. L'AE est de 41 ± 22% en se fondant sur les sorties fécales et la quantité ingérée, hypothèse qui tend à maximiser l'assimilation du Cd, alors qu'on devrait la considérer à 6 ± 1% en tenant compte de la quantité ingérée et du Cd internalisé, hypothèse minimisant AE. Nos résultats ne permettent pas de prouver que l'une des deux interprétations est davantage justifiée que l'autre. Ainsi, du fait qu'il n'a pas été possible d'établir un bilan de masse équilibré en ^{106}Cd, l'AE n'est pas calculable par cette méthode. Notons qu'il n'est pas étonnant de retrouver la valeur de l'AE déterminée par la méthode des ratios (Équation 17), lorsque le calcul est mené suivant notre première hypothèse, puisque dans ce cas les deux méthodes prennent en compte des données quasi-identiques. La seule différence étant que les quantités de traceurs fécales prises en compte dans la méthode du bilan de masse comprennent les petites quantités de traceurs, minoritaires, récupérées après le premier prélèvement (celui qui est pris en compte lors de la méthode des ratios). En conclusion, l'AE du Cd est rigoureusement entre 6 et 40% et nous devons nous en tenir à une estimation moyenne de 23% pour rendre compte de manière synthétique des résultats de notre étude.

Le décompte des quantités ^{65}Cu transitant lors de la digestion des gammares est entaché d'une erreur qui peut-être soit une surestimation du ^{65}Cu fécal, soit une sous-estimation du ^{65}Cu ingéré. Les faibles teneurs en ^{65}Cu des échantillons de fèces des expériences contrôles et des blancs réalisés (au moins deux ordres de grandeurs sous les valeurs des traitements dont il est question) ainsi que la vérification de la performance de la méthode analytique (sur le matériau de référence solide) font privilégier l'hypothèse d'une sous-estimation du ^{65}Cu ingéré. Un effet de matrice, spécifique de la matrice foliaire, pourrait avoir entraîné cette sous-estimation. Il pourrait être réduit en adoptant les recommandations de Lamberty et Muntau (2005) portant sur la minéralisation des matrices organiques en vue de l'analyse des métaux. Enfin, ceci éclaire en partie la question de l'invalidité du calcul de l'AE du cuivre par la méthode des ratios puisque les deux méthodes sont liées : la surestimation du ^{65}Cu dans les feuilles en serait la cause.

Cependant, l'assimilation du cuivre n'a pas été nulle puisque les gammares sont contaminés en ^{65}Cu en fin d'expérience, cf. Figure 32. Nous proposons donc une fenêtre d'estimation de

l'AE du cuivre en analysant la quantité nette de ^{65}Cu des gammares en fin d'expérience. A partir des cinétiques d'élimination du cuivre dans une espèce estuarienne, Clason et Zauke (2000) montrent que les gammares l'éliminent avec une demi-vie d'environ sept jours. Ainsi, un facteur correctif de + 80% (pour une prise en compte de cinq jours de dépuration) a été appliqué afin d'obtenir une teneur en traceur corrigée à *t*=48 h, notée $\Delta[^{65}Cu]_{org,\ 48h}$, selon l'Équation 19 :

Équation 19

$$\Delta\left[{}^{65}Cu\right]_{org,48h} = 1{,}8.\Delta\left[{}^{65}Cu\right]_{org}$$

L'AE du cuivre a été estimée en rapportant cette teneur bioaccumulée à celle des feuilles contaminées, rapport qui est de 6,4%±3,1%.

En conclusion, méthodes des ratios et du bilan de masse ont abouti à des calculs d'AE dans le cas du ^{106}Cd, ce qui montre la faisabilité de la méthode du pulse-chase feeding adaptée au cas de *G. pulex*. Ces quantifications se limitent à une estimation moyenne de l'AE du Cd à 24% et à la détermination de seuils maximal et minimal de l'AE lors de l'expérience, du fait des déséquilibres constatés dans l'établissement du bilan de masse en ^{106}Cd. En revanche, nous n'avons pas quantifié l'AE du Cu par ces méthodes. Nous pensons qu'une mauvaise quantification du ^{65}Cu des feuilles fait obstacle à l'interprétation des résultats de notre étude. Sous cette hypothèse, nous avons tout de même interprété certains résultats pour estimer une AE du Cu à 6%.

III.2.6 Discussion sur la valeur des AE et l'importance relative de la voie trophique de contamination en Cd

III.2.6.1 Comparaison avec les AE chez *Mysis relicta*

Mysis relicta est un crustacé aquatique proche phylogénétiquement des amphipodes[15]. Smokorowski et al. (1998) ont déterminé des AE de 72 % et 21% chez *M. relicta* consommant des daphnies contaminées en Cd et en Cu par un protocole de "pulse-chase feeding". Notre

---

[15] Mysidacés et amphipodes sont des sous-ordres des malacostracés.

étude ne traite pas des influences des facteurs de contrôles de l'assimilation par voie trophique, cependant les tendances mentionnées dans la littérature fournissent des hypothèses pour expliquer pourquoi les AE du Cd et du Cu sont plus faibles dans cette étude que celles de *M. relicta.* Il a été montré que la qualité de la nourriture et le temps de rétention digestive influençaient la valeur de AE pour les métaux chez les bivalves et les copépodes marins :

- Decho et Luoma (1996) ont montré que les AE des métaux augmentaient avec le temps de rétention digestive. On peut donc avancer l'hypothèse que les AE plus fortes pour le Cd et le Cu chez *Mysis relicta* s'expliquent d'une part du fait que le temps de rétention digestive est plus long chez *Mysis relicta* (environ 96 h) que chez *G. pulex* dans notre étude.

- Une proportion plus grande de métaux présents sous des formes 'solubles' dans la nourriture des copépodes marins augmente la valeur de leurs efficacités d'assimilation (Reinfelder et Fisher, 1991). Le terme forme 'soluble' désignant ici les métaux de la fraction cytosolique dans les algues ou les organismes, cf. (Wallace et Luoma, 2003), par opposition aux formes adsorbées ou attachées aux parois cellulaires. Les traceurs adsorbés en surface des feuilles dans notre étude sont donc potentiellement moins biodisponibles que ceux bioaccumulés par les daphnies (présents en une certaine quantité sous forme cytosolique).

III.2.6.2 Importance de la voie trophique par rapport à la voie dissoute

L'importance relative des deux voies de bioaccumulation des métaux dépend du métal et de l'espèce considérée. Certains invertébrés bioaccumulent les métaux presque exclusivement par voie trophique : c'est le cas du Cd et du Zn chez le gastéropode marin *Babylonia formasae* (Wang et Ke, 2002) et celui du Cd, du Cu, du Pb et du Zn chez l'insecte d'eau douce Sialis velta (Croisetiere et al., 2006). Pour d'autres, comme les moules marines et d'eau douce, la prédominance d'une voie sur l'autre dépend de la contamination relative de l'eau et de la nourriture car les deux voies de bioaccumulation ont des cinétiques comparables (Fisher et al., 1996; Roditi et Fisher, 1999). Enfin, l'étude de Eimers et al. (2001) montre que

l'aselle d'eau douce *Asellus racovitzai* accumule le Cd de façon majoritaire par voie dissoute.

Les deux expériences présentées ci-avant (voie dissoute et voie trophique dans le cadre du modèle biodynamique) permettent de mieux caractériser l'importance d'une voie sur l'autre, en prenant en compte le fait que le taux d'ingestion des gammares soit très variable in situ : entre 0,04 et 0,4 $g.g^{-1}. j^{-1}$ (Maltby et al., 2002). Une première comparaison de l'importance des deux voies de bioaccumulation des métaux chez les gammares a été proposée par Abel et Bärlocher (1988) qui indiquent que la voie dissoute de contamination prédomine généralement puisqu'il existe un rapport 3. 10^5 $mL.g^{-1}$ entre la quantité d'eau ventilée par jour par unité de masse de gammare et la quantité de nourriture absorbée (en supposant un taux d'ingestion fixe de 0,05 $g.g^{-1}. j^{-1}$. Ce raisonnement n'est pas spécifique du métal, ce qui laisse supposer que des précisions puissent être apportées à ce sujet.

Selon l'équation du modèle biodynamique, l'influx de Cd par voie trophique est théoriquement supérieur à celui par voie dissoute si la condition suivante est vérifiée :

Équation 20

$$\frac{[M]_f}{[M]} > \frac{k_u}{AE.IR}$$

où $[M]_f$ est la contamination en métal dans les feuilles ($\mu g.g^{-1}$), [M] la concentration dans l'eau ($\mu g.L^{-1}$) et où le membre de droite est composé des paramètres du modèle biodynamique. Nous trouvons, dans le cas du Cd (hypothèse AE=24%), que le membre de droite de l'inéquation est égal à 3,8 10^4 $mL.g^{-1}$ en prenant un taux d'ingestion identique à celui du calcul fait par Abel et Bärlocher (1988). De surcroît, l'Équation 20 montre que ce rapport prend des valeurs inférieures à celle calculées à des taux d'ingestion plus élevés. La prédominance *théorique* de la voie trophique de contamination en Cd sur la voie dissoute est donc plus grande en utilisant le modèle biodynamique que sur la base du taux de ventilation des gammares proposé par Abel et Barlöcher. Pour le cuivre, si l'on s'en tient au taux d'entrée par voie dissoute d'environ 0.1 $L.g^{-1}.j^{-1}$ déduit des cinétiques de bioaccumulation de l'étude de Zauke et al. (1995), nous trouvons que la voie trophique prédomine à partir d'un rapport de contamination de la nourriture sur celle de l'eau de 3,3

10^4 mL.g^{-1}, valeur similaire à celle trouvée pour le Cd.

Les constantes de partage des métaux entre la fraction dissoute de l'eau et les particules en suspension se situent entre 10^3 et 10^6 mL.g^{-1}, elles ont été mesurées par exemple à 10^5 mL.g^{-1} pour le Cd et 10^4 mL.g^{-1} pour le Cu dans l'étude de terrain de Tusseau-Vuillemin et al. (2004a). Si l'on considère que la constante de partage des métaux entre l'eau et la nourriture du milieu reste dans le même ordre de grandeur, les rapports des paramètres biodynamiques du Cd et du Cu montrent donc que *G. pulex* fait partie des espèces pour lesquelles la prédominance d'une voie de contamination sur l'autre dépend de manière cruciale des contaminations relatives de l'eau et de la nourriture, à l'instar de la dreissène cf. (Roditi et Fisher, 1999).

III.3 Conclusions et perspectives

Cette expérience montre que l'utilisation des isotopes stables du Cd afin de mesurer leur assimilation par voie trophique chez *G. pulex* est faisable, en revanche ceci n’a pas été démontré dans le cas du Cu. L'hypothèse que le chrome ne serait pas assimilé par le gammare a été vérifiée expérimentalement et les mesures des concentrations en isotopes du Cr bénéficient largement de la CCT car celle-ci limite les interférences sur ^{52}Cr et ^{53}Cr. Les assimilations du Cu et du Cd par voie trophique ont été mises en évidence. Les efficacités d'assimilation du Cd et du Cu chez le gammare se nourrissant de feuilles d'aulne contaminées en surface ont été estimées à 23% et 6%, respectivement. En théorie, les deux voies de contamination peuvent contribuer à la bioaccumulation globale du Cu et du Cd chez *G. pulex*, l'importance d'une voie de contamination sur l'autre étant dépendante des contaminations relatives des feuilles et de l'eau. La compréhension du processus de bioaccumulation par voie trophique chez *G. pulex* pourrait être prolongée par une étude de l'importance de la qualité de la nourriture sur la bioaccumulation des métaux. Les gammares sont omnivores. Ainsi, l’utilisation de cet organisme ouvre le champ à une étude large sur la biodisponibilité par voie trophique : différents types de nourriture (daphnies, champignons, feuilles) et protocoles de contamination de la nourriture (bioaccumulation, adsorption) pourraient être comparés avec cette même espèce modèle.

IV. QUELS SONT LES LIENS ENTRE LA CONTAMINATION DU MILIEU AQUATIQUE IN SITU ET LA BIOACCUMULATION DES METAUX CHEZ *G. PULEX* ?

La mesure des teneurs en métaux dans un organisme biologique présente deux avantages majeurs par rapport à une mesure dans une matrice physique : les métaux y sont plus concentrés, et les tendances observables reflètent les transferts de métaux dans tous les compartiments environnementaux avec lesquels les organismes sont en contact (les proies, la nourriture, l'eau etc.). C'est pourquoi des programmes de surveillance biologique ont été mis en place (cf. Mussel Watch[16]) ou sont préconisés par la loi, comme la directive européenne établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau (2008). Ce type de mesure des métaux intègre de nombreuses spécificités des sites modifiant la biodisponibilité des contaminants, elles-mêmes soumises à de nombreux facteurs de contrôles limnologiques (crues, blooms algaux, etc.) et biologiques, comme par exemple le comportement des organismes en matière de sélection de la nourriture. Et tant que l'influence quantitative de ces facteurs de contrôles sur la biodisponibilité des contaminants reste méconnue, la mesure des teneurs en métaux dans le biote reste difficile à interpréter.

G. pulex est présent dans la plupart des cours d'eau français et nous avons décrit dans quelle mesure le suivi des teneurs métalliques dans cet organisme avait été validé comme technique de surveillance biologique. Nous avons vu, de plus, que sa teneur en Cd répond à la contamination en Cd de l'eau et des feuilles, lors d'expositions en laboratoire. Ceci fut montré également pour le Zn par voie dissoute (Xu et Pascoe, 1993), et par voie trophique (Xu et Pascoe, 1994). Les liens qui ont pu être ainsi établis en laboratoire, entre une contamination de l'eau ou des feuilles, et un accroissement de la teneur en métaux chez *G. pulex*, devraient pouvoir aider à comprendre comment les gammares se contaminent en situation naturelle et enrichir la signification des mesures de métaux dans cette espèce. C'est dans cet objectif qu'ont été conçues les expériences analysées dans ce chapitre.

---

[16] programme de surveillance des teneurs en microcontaminants dans les moules marines sur 280 sites le long des côtes des Etats-Unis qui dure depuis 1986.

Nous avons cherché à établir dans quelle mesure le modèle biodynamique permettait de faire le lien entre la contamination de l'eau et des feuilles et la contamination d'organismes autochtones (supposés à l'état stationnaire). Cette partie ne traite que du cas des métaux, faute de temps à consacrer à l'analyse des HAP et car la bioaccumulation du B[a]P en laboratoire s'est révélée plus complexe à interpréter que celle du Cd. Au préalable à l'analyse de teneur en métaux dans des gammares autochtones, pour lesquels le scénario d'exposition reste bien souvent inconnu, nous avons recherché une confirmation en conditions semi-contrôlées (organismes transplantés en cage) du fait que la contamination de l'eau en Cd, Ni, Cu Zn peut provoquer une réponse chez *G. pulex.*

IV.1 Validation de modeles de bioaccumulation du Cd et du Zn par voie dissoute chez *G. pulex*

Il a été montré que les gammares transplantés d'un site propre vers un site où l'eau et les particules étaient contaminées en Zn et Pb bioaccumulent ces métaux (Bascombe et al., 1990). Cette réponse biologique pourrait nous renseigner sur les biodisponibilités des métaux pour les gammares en un site donné si on parvenait à établir un lien quantitatif entre la contamination du milieu aquatique et la bioaccumulation. Lors de cette première étude de terrain, notre objectif a été de confirmer l'existence d'un lien entre des accroissements de la biodisponibilité des métaux dans l'eau et des accroissements des teneurs dans les gammares, et de valider la performance des modèles pour décrire des accroissements des teneurs métalliques. Pour cela, nous avons utilisé des mesures de teneurs obtenues grâce à la technique de transplantation des organismes en sites contaminés, couplée à des mesures de concentrations en métal labile.

IV.1.1 Matériel et méthodes

Nous avons bénéficié des données de teneurs en métaux (Cd, Cu, Ni, Zn) dans les organismes de deux campagnes de terrain, appelées Amous et Beaujeu et organisées par nos collègues du Cemagref de Lyon dans l'objectif d'évaluer les différents effets écotoxicologiques de rejets anthropiques sur *G. pulex*. Elles ont été acquises dans le cadre d'un projet dirigé par Olivier Geffard (Cemagref Lyon, Laboratoire d'Ecotoxicologie, Biologie des Ecosystèmes

aquatiques LYon) du programme ECCO (ECODYN). Les concentrations en métaux dissous et labiles et les données physico-chimiques de la campagne Beaujeu ont été obtenues dans le cadre du projet AMPERES (financé par l'ANR-PRECODD) et d'un projet financé par l'Agence de l'eau Rhône Méditerranée et Corse, coordonnés par Marina Coquery et Cécile Miège, respectivement (Cemagref Lyon, UR Qualité des Eaux et Prévention des Pollutions). Enfin, les concentrations en métaux labiles lors de la campagne Amous ont été mesurées dans le cadre d'une collaboration avec Olivier Geffard. Lors de ces campagnes, des gammares ont été transplantés sur plusieurs sites susceptibles de présenter un contraste amont-aval de contamination métallique de l'eau. Nous analysons les accroissements des teneurs métalliques dans *G. pulex* en lien avec les concentrations en métal labile.

IV.1.1.1 Organismes et sites d'étude

Les populations de gammares ont été prélevées dans la Bourbe, à la Tour du Pin, où leur contamination initiale en métaux se situe entre 0,1 et 0,3 $\mu g.g^{-1}$ pour le Cd et de 60 à 80 $\mu g.g^{-1}$ de Zn (Geffard et al., 2007). Par tamisage entre les tamis d'ouverture 2 mm et 2,5 mm, seuls les gammares adultes ont été sélectionnés, de taille égale à 11 mm à 20% près. Par ailleurs, les caractéristiques de l'eau de la Bourbre à la Tour du Pin sont les suivantes : environ 110 $mg.L^{-1}$ de $[Ca^{2+}]$, 3 $mg.L^{-1}$ de COD et pH 8 (Geffard et al., 2007).

Les origines des pollutions sont différentes pour chaque campagne. Le bassin versant de la rivière Amous (département du Gard, affluent du Gardon d'Anduze puis du Rhône) contient l'ancienne mine de Carnoulès où du Pb et du Zn étaient extraits jusqu'en 1963. Depuis, de la pyrite (FeS_2), de l'arsenic et des métaux traces (Pb, Cd, et Zn) contaminent la rivière sous l'effet du ruissellement et de l'infiltration de l'eau pluviale à l'endroit de la carrière de stock des déchets de cette ancienne mine (Casiot et al., 2003). La pollution de l'Amous s'effectue via un petit ru, la confluence étant située entre les sites Amont 2 et Aval 1, cf. Figure 37. La campagne a eu lieu entre le 26/03/2008 et le 14/04/2008.

Le bassin versant de la rivière Ardières est situé dans la région viticole du Beaujolais (département du Rhône). L'Ardières présente un débit moyen interannuel de 1 $m^3.s^{-1}$ à Beaujeu (banque de données Hydro) et se jette dans la Saône. La viticulture représente 44 % de l'occupation du sol de ce bassin versant. Les traitements de la vigne génèrent une

pollution diffuse en produits phytosanitaires et en métaux (Cu, Cd). Les points amont 2 et aval 1 sont situés avant et après le rejet de la station d'épuration de Beaujeu, cf.Figure 37. La campagne a eu lieu entre le 10/06/2008 et le 30/06/2008.

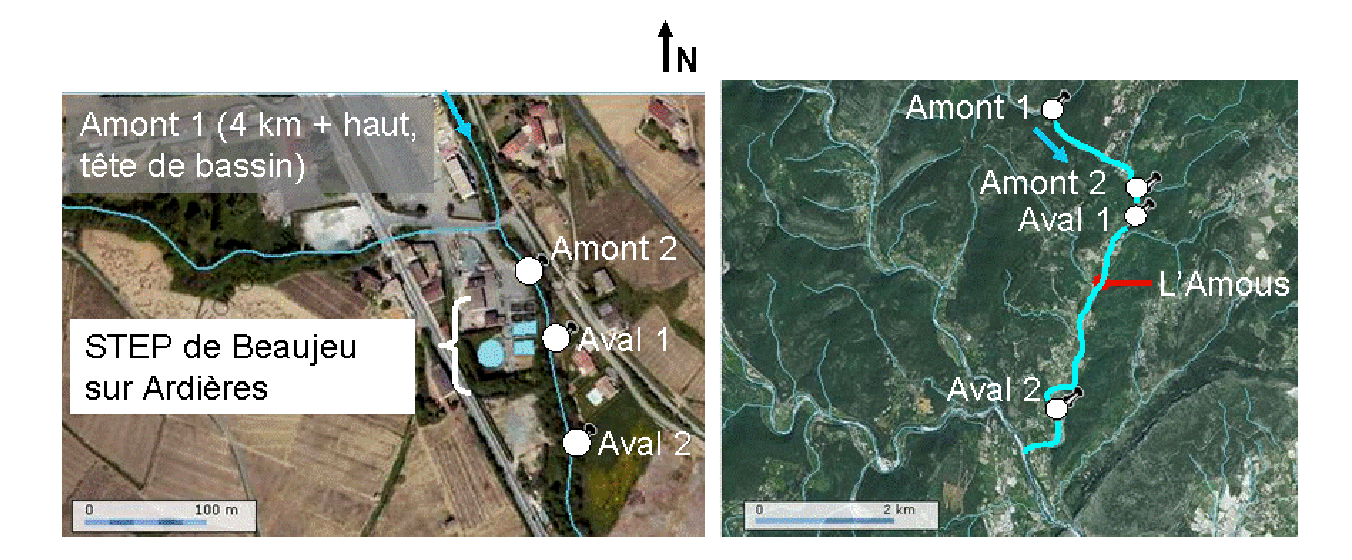


Figure 37 Localisation des stations pour les campagnes Amous (carte à droite) et Beaujeu (carte à gauche)

Les caractéristiques de l'eau sont données dans le Tableau 8.

	$[Ca^{2+}]$ (mg.L^{-1})	COD (mg.L^{-1})	pH
L'Amous	88	2,1	8,2
L'Ardières à St-Jean d'Ardières (pour Beaujeu)	18	3	7,5

Tableau 8 Caractéristiques de l'eau des cours d'eau des campagnes de transplantation de gammares.

IV.1.1.2 Technique de transplantation et analyse

Une centaine de gammares a été transplantée sur les sites dans des cages qui sont constituées d'une caisse en plastique contenant des chambres d'exposition, cf. Figure 38.

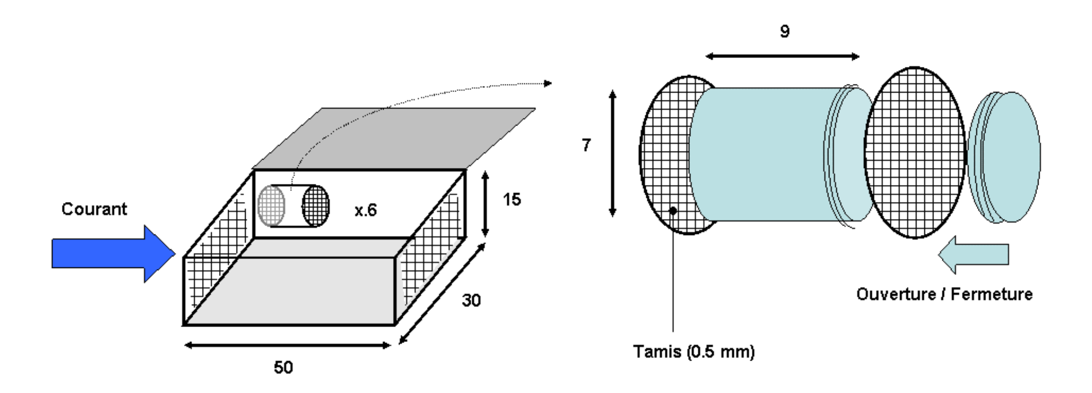


Figure 38 Dispositif de cage utilisé lors de transplantation de gammares *in situ* et contenant des chambres d'exposition (détaillées à droite). Les dimensions sont en cm. Le couvercle de la caisse se referme et deux montants opposés permettent au courant de traverser le dispositif.

Six chambres d'exposition, cylindres en polychlorure de vinyle fermés aux deux extrémités par du tamis en nylon de 0,5 mm, ont été disposées à l'intérieur des caisses. Les chambres peuvent contenir entre cinq et dix gammares, soit de trente à soixante gammares par caisse. Deux caisses ont été utilisées sur chaque site. Les gammares étaient nourris de feuilles d'aulne conditionnées suivant le protocole de Felten (2003).

Trois groupes de huit gammares ont été prélevés après 7 j, 14 j et 21 j de transplantation. Ils ont été lyophilisés et pesés poids sec. De plus, pour la campagne Amous, les gammares ont été broyés dans du tampon TRIS et le broyat a été séparé en deux fractions, par centrifugation, afin de réaliser des mesures biochimiques non traitées ici (la somme des teneurs métalliques de ces deux fractions a été prise en compte). Au laboratoire d'écotoxicologie de l'Université de Reims, les échantillons des trois campagnes ont subi une minéralisation acide à chaud et ont été analysés en spectrométrie d'absorption atomique (four pour Cd, Cu et Ni et flamme pour Zn). La teneur en Ni des gammares de la campagne Amous n'a pas été analysée.

IV.1.1.3 Mesure des concentrations en métaux labiles

Les concentrations en métaux labiles ont été mesurées par la technique de la DGT, à raison de six DGT par site, munis de gels restrictifs. Des temps d'intégration de sept jours (3 DGT) et de quatorze jours (3 DGT) ont été respectés. L'analyse des éluats de DGT a été faite en ICP-MS au Laboratoire d'analyses physico-chimiques des milieux aquatiques du Cemagref de Lyon. Les étapes de calcul menant de la concentration en métal dans l'éluat à la

concentration en métal labile dans l'eau sont identiques à celles détaillées précédemment.

IV.1.1.4 Cadre de l'analyse

Les cinétiques du Cd et du Zn chez *G. pulex* ont été analysées grâce au modèle développé dans cette thèse pour le Cd et grâce à celui de Xu et Pascoe pour le Zn (Xu et Pascoe, 1994). Nous avons fait l'hypothèse que la concentration en Cd et Zn biodisponible était égale à celle en métal labile. Ne disposant pas de modèles de bioaccumulation du Cu et du Ni chez *G. pulex*, leurs cinétiques n'ont pas été modélisées. Les modèles de bioaccumulation du Cd et le Zn ne sont pas du même type. Le premier est de type biodynamique, c'est-à-dire porte sur les échanges de métal entre le stock entier bioaccumulé par l'organisme et son milieu. Le second modèle porte sur les influx et les efflux de Zn surajouté par rapport à une teneur essentielle en Zn fixée.

Les variations des teneurs en Cd avec le temps à chaque site ont été modélisées par l'Équation 21 :

Équation 21

$$[Cd]_{org}(t) = \frac{k_u.[Cd]_{DGT} + AE.IR.[Cd]_f}{k_e + g}(1 - \exp(-\frac{t}{k_e + g})) + [Cd]^0_{org}.\exp(-\frac{t}{k_e + g})$$

où les variables sont : $[Cd]_{org}(t)$, la teneur en fonction du temps t (en j), $[Cd]_{DGT}$ la concentration en Cd labile du site (µg.L^{-1}), *t* le temps (j), $[Cd]_f$ la teneur en Cd des feuilles consommées (µg.g^{-1}). Les paramètres du modèle sont récapitulés au Tableau 9. Le taux d'entrée par voie dissoute du Cd a été pris à 0,38 L.g^{-1}.j^{-1} pour les sites de la campagne Beaujeu et 0,46 pour la campagne Amous, conformément aux résultats du modèle et en tenant compte de l'influence du calcium (Pellet et al., 2008), et sur la base des mêmes travaux, une constante d'élimination de 0,032 j^{-1} a été choisie. L'efficacité d'assimilation (AE) par voie trophique a été fixée à 0,4 (sans unité), conformément au résultat de la Partie 3 de cette thèse. Un taux d'ingestion de 0,1 g.g^{-1}.j^{-1} a été considéré, sur la base de la température de l'eau et de la relation établie par Matlby et al. (2002) entre ce paramètre et la température. Enfin, g est le taux de croissance des organismes (j^{-1}), à déterminer si l'évolution du poids moyen des gammares au cours du temps est significative, ce qui a été

testé par ANOVA, et $[Cd]_{org}^0$ est la teneur en Cd initiale de la population de gammares ($\mu g.g^{-1}$) dont nous détaillons plus loin la détermination. Cette équation est la solution variable dans le temps de l'équation biodynamique qui satisfait à la condition initiale $[Cd]_{org\ (t=0)}=Cd]_{org}^0$.

Les variations des teneurs en Zn avec le temps à chaque site ont été modélisées par l'Équation 22 :

Équation 22

$$[Zn]_{org}(t) = \frac{k_1.[Zn]_{DGT} + AE.IR.[Zn]_f}{k_2 + g}(1 - \exp(-\frac{t}{k_2 + g})) + [Zn]_{org}^e$$

où les variables sont : $[Zn]_{org}(t)$ la teneur en Zn en fonction du temps t (en j), t le temps (j), $[Zn]_{DGT}$ la concentration en Zn labile ($\mu g.L^{-1}$) et $[Zn]_f$ la teneur en Zn des feuilles consommées ($\mu g.g^{-1}$). Les paramètres du modèle sont récapitulés au Tableau 9. Le paramètre d'accumulation du Zn en excès par voie dissoute, k_1, et le taux de dépuration du Zn en excès, k_2 ont été pris à 0,08 $L.g^{-1}.j^{-1}$ et 0,35 j^{-1}, respectivement. L'efficacité d'assimilation par voie trophique déterminée par Xu et Pascoe (1994) est de 0,014 (sans unité). Comme dans le cas du Cd, IR est choisi à 0,1 $g.g^{-1}.j^{-1}$, g est à déterminer en fonction des résultats des poids des gammares et $[Zn]_{org}^e$ est la teneur essentielle en Zn de la population de gammares (en $\mu g.g^{-1}$).

Les poids des gammares ne suivent pas de tendance significative dans le temps aux sites de la campagne Amous (ANOVA, *p* compris entre 0,36 et 0,85 selon les sites). Lors de la campagne Beaujeu, nous ne disposons des poids individuels que pour les deux premiers temps d'échantillonnage et ils n'évoluent pas significativement (test de Wilcoxon, *p* compris entre 0,26 et 0,82 selon les sites). Ainsi, nous pouvons négliger le paramètre de croissance individuelle (g) dans les modèles.

Cd	k_u	k_e	AE	$[Cd]_{org}^{\circ}$	*$[Cd]_f$*	IR	g
	0,46/0,38	0,031	0,4	0,19/0,39	0,05		
Zn	k_1	k_2	AE	$[Zn]_{org}^{e}$	*$[Zn]_f$*	0,1	0
	0,08	0,35	0,014	63,1/63,6	45,5		

Tableau 9 Récapitulatif des paramètres des modèles de bioaccumulation du Cd et du Zn chez *G. pulex* et de la variable "teneur en métal dans les feuilles" fixée à une unique valeur pour tous les sites de cette étude. Unités : cf. texte. Lors que le symbole "/" sépare deux valeurs, la première vaut pour la campagne Amous et la seconde pour Beaujeu.

La teneur en métaux dans les feuilles a été choisie égale à celle mesurée sur un lot de feuilles conditionnées par le même protocole en 2006, de 0,05 $\mu g.g^{-1}$ de Cd et à celle mesurée sur des feuilles de marronnier par Xu et Pascoe (1994) de 45,5 $\mu g.g^{-1}$ de Zn. Nous ne disposons pas des teneurs initiales en métaux des populations de gammares utilisées pour chaque campagne. Les constantes $[Cd]_{org}^{0}$ et $[Zn]_{org}^{e}$ ont donc été déterminées en faisant l'hypothèse que ces teneurs initiales étaient retrouvées au moins une fois par campagne dans la teneur d'un prélèvement. Nous avons pris $[Cd]_{org}^{0}$ et $[Zn]_{org}^{e}$ égales aux teneurs minimales mesurées en tous sites, à tous les temps d'échantillonnage, celles-ci ne faisant qu'augmenter ou rester constantes à tous les sites (sauf en Zn au site Amous - aval 2, ce qui n'est pas gênant car la teneur minimale en Zn de cette campagne n'est pas atteinte à ce site). Les valeurs ainsi déterminées pour les campagnes Beaujeu et Amous (respectivement en Zn de 63,6 et de 63,1 $\mu g.g^{-1}$, en Cd de 0,39 et de 0,19 $\mu g.g^{-1}$) sont dans la fourchette des teneurs des populations de gammares autochtones de la Bourbre indiquée par Geffard et al. (2007).

La performance de ces modèles a été estimée en confrontant la teneur modélisée après une semaine à celle observée. Le premier temps d'échantillonnage a été retenu comme point de comparaison car les incertitudes, portant d'une part sur la teneur en Cd et en Zn de la nourriture (susceptible de se contaminer par absorption et adsorption de métal en provenance de l'eau) et d'autre part sur les conditions de santé des gammares, y sont moindres qu'aux temps suivants. Le test du khi-deux a été appliqué pour déterminer

l'adéquation des observations aux prévisions des modèles.

IV.1.2 Résultats et discussion

IV.1.2.1 Cadmium

Pour les sites des deux campagnes Beaujeu et Amous, les teneurs en Cd croissent de manière significative dans le temps (au seuil 0,1 près) aux quatre sites où les concentrations en Cd labile sont les plus élevées. Elles ne suivent pas de tendance particulière aux autres sites, cf. Figure 39.

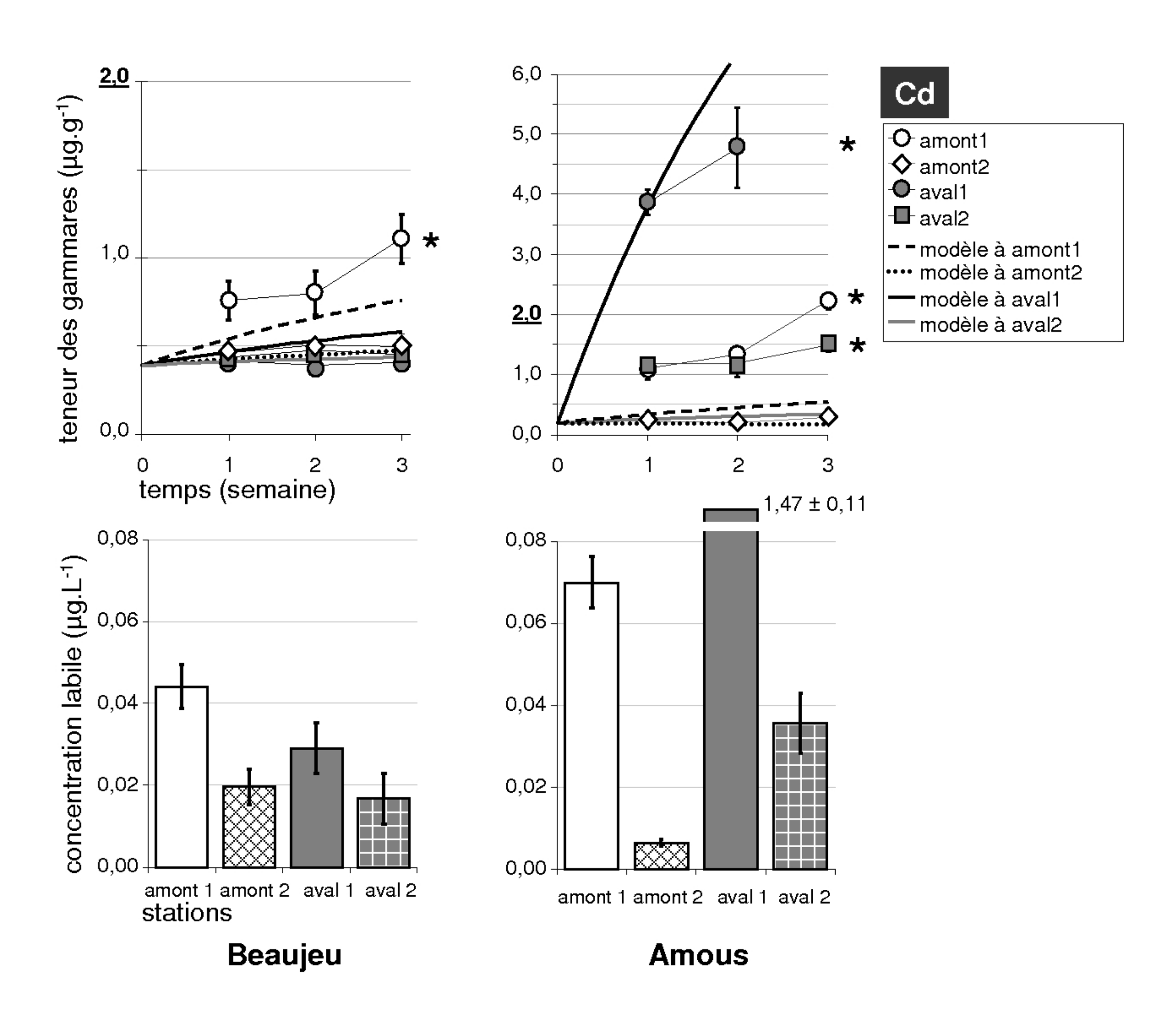


Figure 39 Teneurs en Cd dans les gammares transplantés (en haut) et concentrations labiles en Cd (en bas) aux sites des campagnes Beaujeu et Amous. Les courbes des graphiques de bioaccumulation sont celles du modèle biodynamique, tenant compte de la contamination des feuilles et de la concentration en métal labile à chaque site. * indique les sites auxquels les teneurs en Cd croissent significativement avec le temps à p=0,1 près (Beaujeu amont 1, p=0,02, Amous amont 1, p=0,00004, Amous aval 1, p=0,09, Amous aval 2, p=0,06).

L'augmentation des teneurs en Cd des gammares traduit donc la présence de Cd dans l'eau.

En dessous d'un seuil de concentration en Cd labile de 0,030 µg.L^{-1}, aucun accroissement de bioaccumulation de Cd n'est mesuré. Le modèle de bioaccumulation reflète bien la stagnation des teneurs aux sites les moins contaminés ainsi que la teneur après une semaine provoquée au site le plus contaminé (Amous aval 1). En revanche, il sous-estime les teneurs observées au site de Beaujeu amont 1 et plus encore aux sites Amous amont 1 et aval 2. La Figure 40 montre la comparaison des prévisions après une semaine aux observations. Le modèle s'accorde aux données de manière significative, la valeur du khi-deux étant inférieure au khi-deux critique à sept degrés de liberté au seuil α=0,05 (5,4 < 14,1).

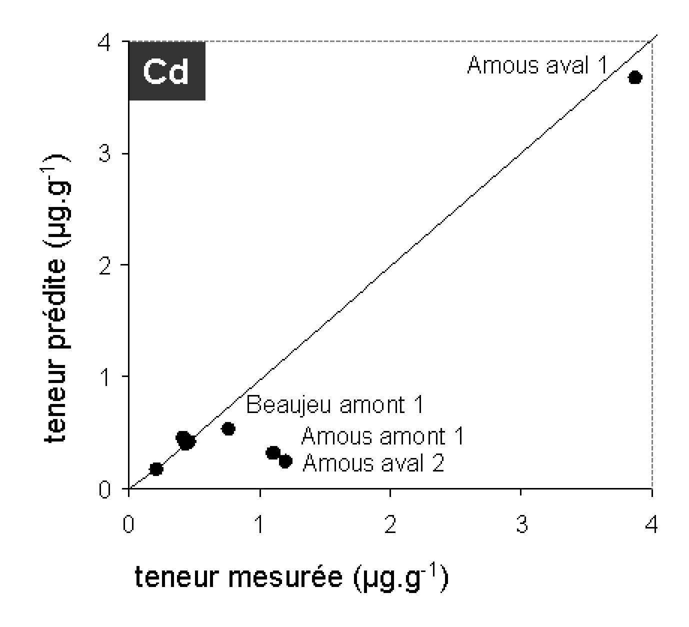


Figure 40 Comparaison des prévisions des teneurs bioaccumulées par les gammares après une semaine par le modèle biodynamique aux teneurs mesurées.

La voie trophique de bioaccumulation représente une part de l'entrée de Cd calculée par notre modèle comprise entre 0 et 15% (selon les sites, et sauf au site Amous amont 2 où les deux entrées de Cd sont très faibles et comparables pour les deux voies). Notre méthode de modélisation suppose donc que la voie dissoute de bioaccumulation prédomine le phénomène observé. Cette hypothèse est utile dans la mesure où la contamination en métaux des feuilles n'a pas été suivie lors de ces campagnes. Néanmoins, la sous-estimation des prévisions aux sites Amous amont 1, Amous aval 2 et Beaujeu aval 2 mène à penser que cette hypothèse est fausse. A ce propos, il a été montré que le taux de nutrition des gammares diminuait en présence d'une contamination métallique de l'eau en Cd -à partir de 8 µg.L^{-1} dans l'étude de Felten et al. (2008)- et pouvait même chuter sous l'effet d'une

multi-contamination (Maltby et Crane, 1994). Il est donc plausible que les gammares du site Amous aval 1 n'aient pas consommée les feuilles proposées du fait de la contamination exceptionnelle à ce site (en métaux et en As). Or, c'est le seul site où la prévision ne sous-estime pas l'observation. Ceci renforce l'hypothèse que la sous-estimation des prévisions aux trois autres sites contaminés puisse être due à une contamination des feuilles en Cd lors de la transplantation en un temps plus court qu'une semaine, et à leur consommation par les gammares.

Enfin, entre les deux sites Beaujeu aval 1 et Amous aval 2, la concentration en Cd labile est similaire (0,029 ± 0,006 et 0,036 ± 0,010 $\mu g.L^{-1}$) et la dureté calcique est différente (18 et 88 $mg.L^{-1}$). Un accroissement significatif des teneurs en Cd des gammares n'a été constaté qu'au site de plus forte dureté de l'eau (Amous aval 2). Ce résultat est étonnant car nous avons montré que le calcium a un effet inhibiteur de la cinétique d'entrée par voie dissoute du Cd. Pouvoir conclure de cela que la voie trophique de bioaccumulation prédomine dans le phénomène de bioaccumulation au site Amous aval 2, nécessiterait que l'on connaisse les contaminations de la nourriture des gammares aux deux sites et l'influence du calcium sur cette voie d'accumulation chez *G. pulex*, ce qui n'est pas le cas. Nous notons cependant qu'il a été montré chez la daphnie que le calcium est un inhibiteur de la cinétique d'entrée par voie trophique du Cd également (Tan et Wang, 2008). Et qu'en conséquence, l'hypothèse la plus vraisemblable est que la bioaccumulation à ces sites s'est faite en majorité par voie trophique et que l'alimentation des gammares devait être plus contaminée au site Amous aval 2 qu'à Beaujeu aval 1 (du fait de particules organiques contaminées en Cd dans l'Amous, par exemple).

En conclusion, il a été mis en évidence que des différences entre les sites de concentrations en Cd labiles provoquent des accroissements dans le temps des teneurs en Cd de gammares transplantés. Le modèle biodynamique simplifié tenant compte principalement de la voie dissoute de bioaccumulation s'accorde aux accroissements observés après une semaine aux différents sites. Néanmoins, l'analyse site par site permet d'avancer l'hypothèse qu'une partie de la bioaccumulation à eu lieu par la voie trophique. Enfin, nos résultats ne nous permettent pas de valider l'effet inhibiteur de la concentration en calcium sur l'entrée du Cd par voie dissoute chez *G. pulex* montré en laboratoire.

IV.1.2.2 Zinc

Aux trois sites de la campagne Amous où les concentrations en Zn labiles sont les plus élevées, les teneurs en Zn après une semaine sont significativement supérieures à celles des autres gammares de la même campagne, cf. Figure 41. Ces teneurs n'évoluent pas de manière significative entre deux et trois semaines d'exposition lors de cette campagne (sauf au site Amous aval 2 où elles diminuent, pour des raisons difficiles à établir). La bioaccumulation du Zn est donc une réponse à la contamination de l'eau atteignant un état stationnaire après une semaine sous exposition constante par voie dissoute.

Lors de la campagne Beaujeu, les différences entre les sites des teneurs en Zn dans les gammares sont plus faibles après une semaine (seule la teneur au site Beaujeu aval 2 est significativement supérieure à celle à Beaujeu amont 1).

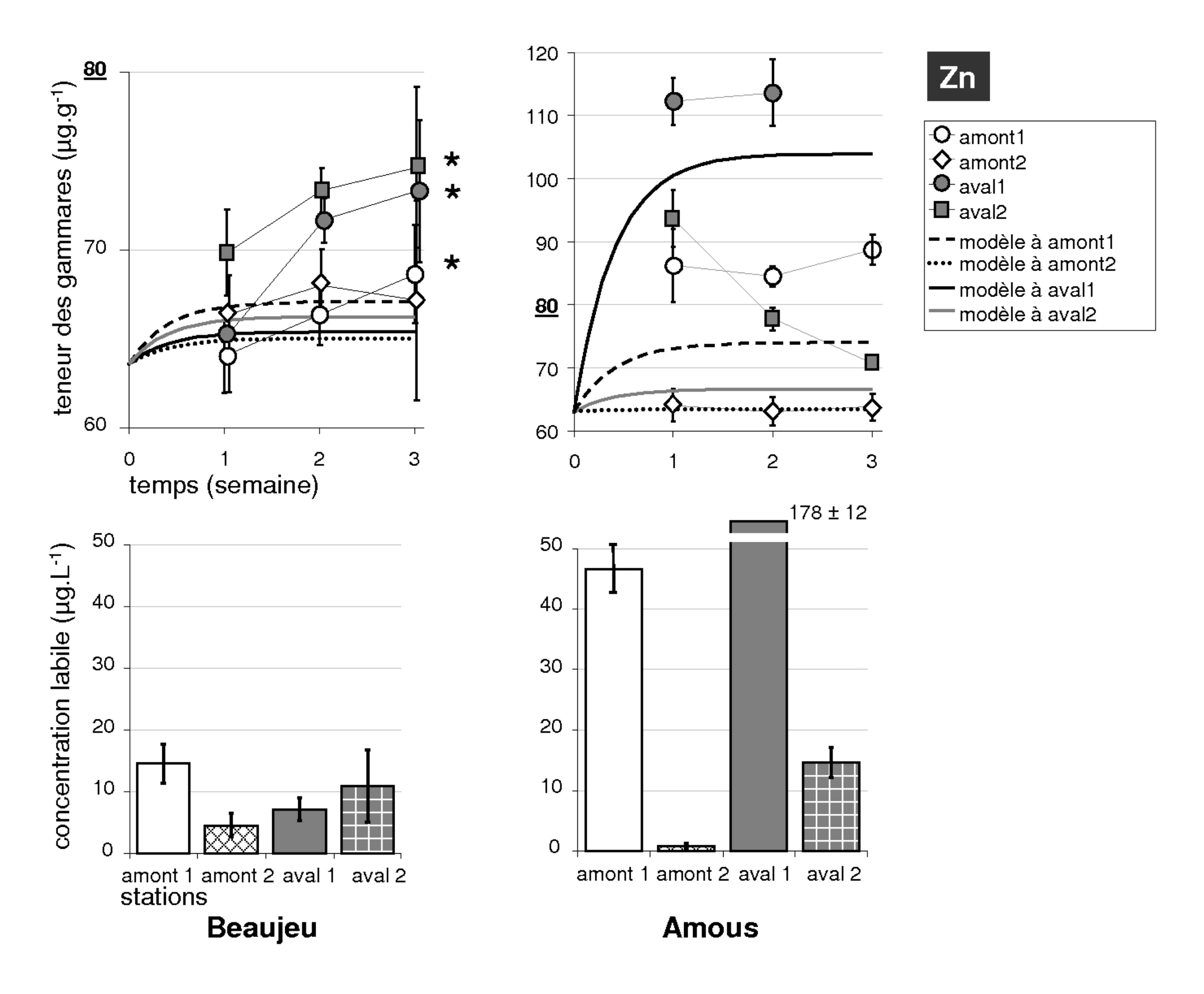


Figure 41 Teneurs en Zn dans les gammares transplantés (en haut) et concentrations labiles (en bas) aux sites des campagnes Beaujeu et Amous. Les courbes sont celles du modèle de Xue and Pascoe (2003, 2005), tenant compte de la contamination des feuilles et de la concentration en métal labile de chaque site. * indique les sites auxquels les teneurs en Zn croissent significativement avec le temps à p=0,1 près (Beaujeu amont 1, p=0,03, Beaujeu aval 1, p=0,02, Beaujeu aval 2, p=0,08).

Le modèle de bioaccumulation sous-estime systématiquement les teneurs en Zn, en particulier après une semaine (la seule exception étant la prévision à trois semaines au site Beaujeu amont 1). Les observations sont significativement différentes des prévisions du modèle (khi-deux = 15,4 supérieur au seuil de 14,1 pour un khi-deux à sept degrés de liberté, α=0,05). En revanche, la stagnation des teneurs entre une et trois semaines correspond bien à la valeur faible du temps caractéristique du processus de bioaccumulation du Zn du modèle de Xu et Pascoe (1993). Par ailleurs, ce modèle implique une large prédominance de la voie dissoute de bioaccumulation qui se traduit en particulier dans le choix d'une efficacité d'assimilation du Zn de 1,4%, ce que nos données ne permettent pas de valider ou d'invalider.

Le caractère essentiel d'un métal n'empêche pas qu'il puisse être bioaccumulé par les

gammares transplantés d'un site propre vers un site contaminé (Bascombe et al., 1990; Fraboulet et al., 1992). Cependant nous avons vu que le modèle du Zn différait de celui du Cd en étant contraint de fournir des prévisions supérieures ou égales à une concentration en Zn donnée (basale). Le modèle biodynamique, appliqué à des métaux essentiels, "reconstruit" cette teneur basale à partir des échanges entre l'organisme et son environnement (Luoma et Rainbow, 2005). Cette teneur basale s'exprime alors en fonction de la présence des métaux dans le milieu aquatique suivant l'Equation 8 (qui est aussi le terme multiplicatif de l'Equation 21). On notera, qu'à moins de tenir compte des possibles variabilités (temporelle et spatiale) des paramètres du modèle (k_u, k_e, AE, IR, g), il n'est pas possible de modéliser par l'Equation 8 une des caractéristiques des teneurs en métaux essentiels qui est de conserver une valeur constante en dépit des fluctuations de la biodisponibilité des métaux dans l'eau et la nourriture. Il reste que, lors de transplantation en milieu assez contaminé pour provoquer une bioaccumulation d'un métal essentiel, comparer la performance du modèle développé par Xue et Pascoe (repris dans notre étude) et du modèle biodynamique permettrait de valider (ou non) la possible généralisation de ce dernier.

IV.1.2.3 Cuivre et Nickel

Les concentrations en Cu ou Ni labile des sites avals des campagnes Amous (Cu) et Beaujeu (Cu et Ni) sont supérieures à celles des sites amonts, cf. Figure 42. En revanche, après une semaine d'exposition, les teneurs en Cu et en Ni dans les gammares ne sont pas statistiquement plus élevées aux sites à l'aval qu'aux sites à l'amont lors de ces campagnes.

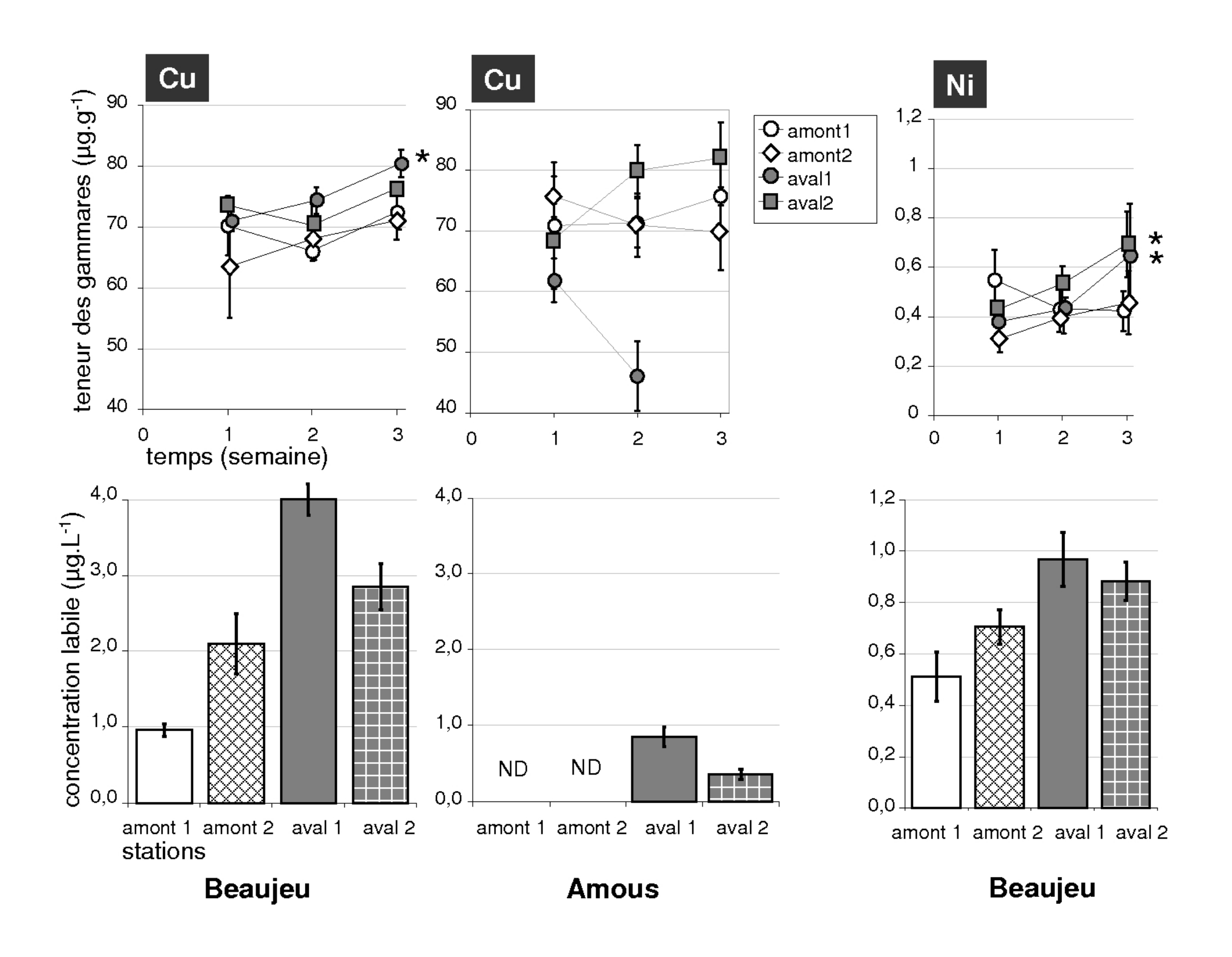


Figure 42 Teneurs en Cu et Ni dans les gammares transplantés (en haut) et concentrations labiles (en bas) aux sites des campagnes Beaujeu et Amous. Les teneurs en Ni des gammares n'ont pas été déterminées lors de la campagne Amous. * indique une augmentation stricte des teneurs dans le temps aux sites de transplantation, i.e. les trois mesures de la semaine 1 sont inférieures à celles de la semaine 2, elles-mêmes inférieures à celles de la semaine 3.

Ces données permettent tout de même d'établir un lien qualitatif entre la contamination de l'eau en Cu et en Ni labile et la bioaccumulation : les teneurs en Cu des gammares croissent dans le temps au site Beaujeu aval 1, site où la concentration en Cu labile est la plus élevée de cette étude. Celles en Ni croissent aux sites Beaujeu aval 1 et 2, où l'on note aussi des concentrations en Ni labile plus élevées qu'à l'amont.

IV.1.3 Conclusions

En conclusion, des accroissements des teneurs bioaccumulées en Cd et Zn dans les gammares ont bien été provoqués par des différences de concentration en Cd et Zn labile lors des campagnes de transplantation de gammares. De manière qualitative, on observe également que les teneurs en Cu ont tendance à augmenter lorsque la concentration en Cu

labile fait partie des maxima parmi les sites de transplantation. L'intensité maximale d'une augmentation de la teneur métallique et son temps caractéristique dépendent de chaque métal. Les modèles de bioaccumulation du Cd et du Zn par les gammares en fonction des concentrations en Cd labile et en Zn labile reproduisent de manière convenable soit ces deux caractéristiques (modèle Cd) soit le temps caractéristique uniquement (modèle Zn, l'intensité de l'augmentation est, elle, sous-estimée). Cette étude ne permet pas de conclure sur l'importance de la voie trophique de contamination des gammares ainsi que sur l'influence du calcium sur la biodisponibilité du Cd. Cependant, il semble qu'il soit important de tenir compte de la voie trophique en ce qui concerne le Cd. En perspective, la performance d'un modèle biodynamique du Zn adapté à *G. pulex* mériterait d'être comparée à celle du modèle proposé dans cette étude. En effet, il serait plus simple de n'utiliser qu'un seul type de modèle pour les métaux essentiels (Cu, Ni, Zn) et non-essentiels (Cd, Pb), s'il était justifié que cela soit possible.

IV.2 VARIABILITE DES MESURES DE METAUX DANS *G. PULEX (*AUTOCHTONE) ET SENSIBILITE A LA CONTAMINATION DE L'EAU ET DES FEUILLES

Par rapport à la transplantation d'organismes en cage, l'étude de la bioaccumulation des métaux chez des gammares autochtones relève d'une démarche davantage exploratoire. Nous avons d'abord cherché à valider un protocole de mesure de la contamination du biote (*G. pulex*) en métaux, et profité de cette validation pour réaliser une étude de cas, c'est-à-dire un recueil d'observations ciblées ayant pour but de répondre aux questions suivantes :

- Observe-t-on des variations saisonnières des teneurs dans les gammares ? Est-ce que des mesures de métaux dans *G. pulex* doivent être simultanées pour être comparables ? Une question corollaire étant : peut-on envisager de manière raisonnable que la teneur en métaux dans les gammares soit à l'état stationnaire (éventuellement à une période de l'année donnée) ?

- Observe-t-on un lien entre la contamination du milieu aquatique (i.e. de l'eau et des feuilles) et ses caractéristiques physico-chimiques (concentration en ion calcium), et les

teneurs métalliques bioaccumulées ?

- Constate-t-on une différence entre les teneurs métalliques des gammares autochtones entre un site situé à l'amont (sous couvert forestier, en tête de bassin) et un autre en aval (en milieu urbain, soumis à différents rejets de stations d'épuration) ?

IV.2.1 Matériel et méthodes

IV.2.1.1 Choix du site

Nous avons choisi de travailler sur la rivière Mauldre car elle a été identifiée par la Direction Régionale de l'Environnement comme présentant une qualité médiocre du point de vue de la contamination métallique cf. carte de contamination en métaux des sédiments entre 2001 et 2004, *in* rapport du service des milieux aquatiques de la DIREN "Infotoxique n°1" (2005). Le Cd (et les HAP) ont fait partie des substances ayant provoqué le déclassement en qualité moyenne des seuils du système d'évaluation de la qualité de l'eau (SEQ-eau) de la station la Mauldre à Mareil-sur-Mauldre en 2003, cf. Tableau 10. A cette station, une présence importante de *G. pulex* a été observée. Enfin, le bassin de la Mauldre offre la possibilité de se rapporter à un site amont en tête du bassin –très peu urbanisé.

Commune	benzo[a]pyrène sur sédiment µg/kg sec	Cd sur sédiment µg/kg sec
Beynes	310	0,5
Mareil-sur-Mauldre	1310	1,1
Épône	990	1

Tableau 10 Teneur en B[a]P et en Cd des sédiments à trois stations de la rivière la Mauldre en 2003 (station du Réseau National de Bassin n° 168995, 169500 et 170100).

Nous avons donc retenu deux sites du bassin de la Mauldre qui correspondent à des stations des réseaux de suivi de la qualité de l'eau du bassin Seine-Normandie, cf. Figure 43.

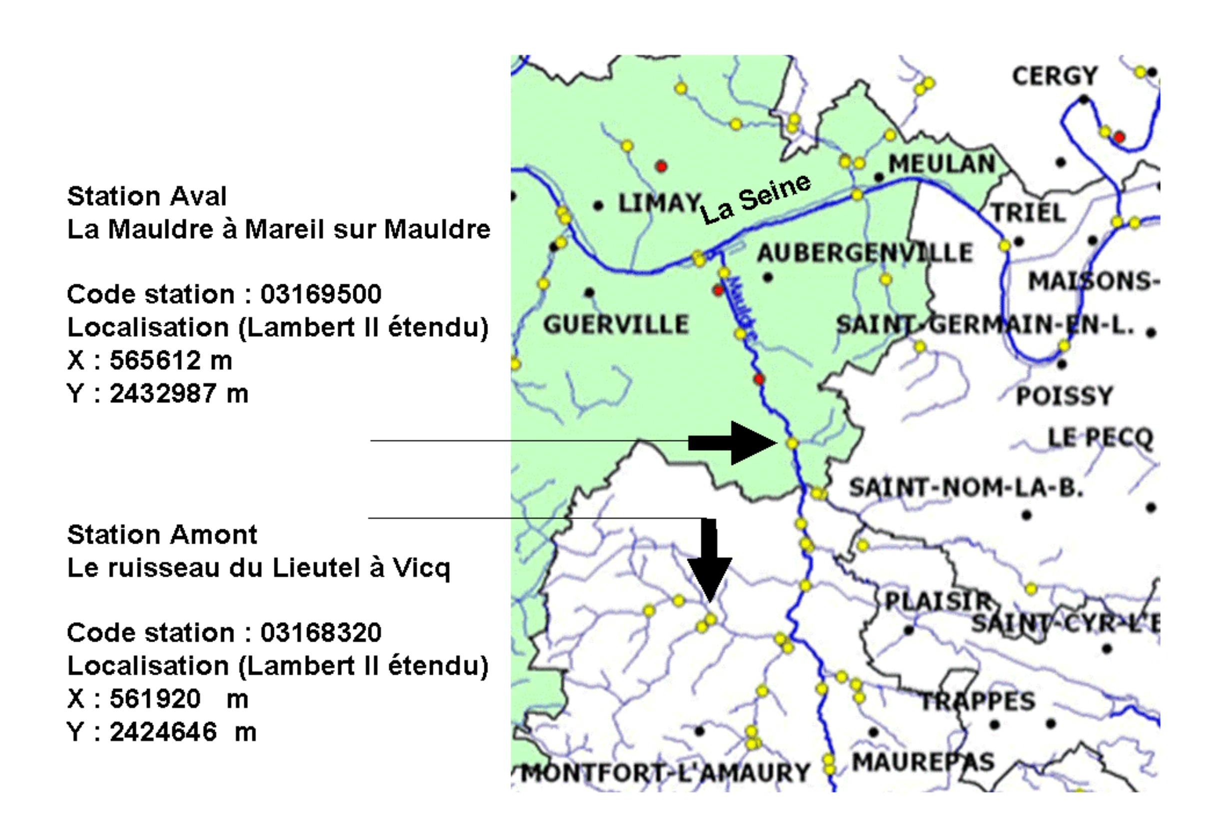


Figure 43 Localisation des stations dans le bassin versant de la Mauldre (Yvelines)

IV.2.1.2 Données acquises

A Mareil-sur-Mauldre, des mesures mensuelles ont été effectuées du mois de novembre 2006 au mois de juillet 2007 (sauf en avril). Elles sont constituées d'un prélèvement de gammares, de mesures de concentrations métalliques dans l'eau (fraction totale, dissoute et labile) et de mesures physico-chimiques. Au Lieutel à Vicq, une campagne du même type a été effectuée au mois d'avril 2007.

Les invertébrés de la rivière ont été prélevés au filet surber puis triés par classe de taille sur une colonne de tamis (1 mm – 2 mm - 2,5 mm- 5 mm). Les gammares de la fraction 2 mm – 2,5 mm ont été retenus, ils mesurent en moyenne 13,4 mm ± 2 mm, ce qui correspond aux individus adultes étudiés dans cette thèse. A Mareil-sur-Mauldre, le prélèvement a été fait en amont d'un rejet d'eau de ruissellement routier. Ces gammares ont été triés en laboratoire puis échantillonnés par groupe de cinq individus, à raison de neuf échantillons par campagne. Ces groupes ont été séchés, pesés puis minéralisés par le protocole de minéralisation à froid décrit précédemment. Entre dix et vingt individus ont été conservés dans 10 mL d'éthanol à 70%, en vue de leur reconnaissance taxonomique. Aucun de ces

prélèvements n'a comporté d'individus d'une autre espèce que *Gammarus pulex* ou *Gammarus fossarum*. Les minéralisats ont été analysés en spectrométrie d'absorption atomique four (AAS pour le Cd) et en spectrométrie d'émission atomique à source plasma à couplage inductif (ICP-AES, pour Cu, Ni, Zn).

Les concentrations labiles de ces mêmes métaux ont été mesurées par la technique de la DGT, au moyen de six DGT munies de gels restrictifs (DGT-R, deux temps d'intégration de 3 et 7 j). De plus, la concentration labile par DGT avec gel non-restrictifs (DGT-NR au nombre de trois par campagne) a été mesurée lors de cinq campagnes (février, mars, avril, mai et juillet). La technique employée et l'exploitation des résultats sont identiques à ce qui a été décrit précédemment (p 84), à la seule exception près que les DGT comportaient un filtre en polycarbonate supplémentaire au contact de l'eau, qui protège le dispositif des aléas liés aux conditions naturelles. Les concentrations en métaux dans l'eau brute (dites « totales ») et dans l'eau filtrée à 0,45 µm (dites « dissoutes », échantillonnées par filtration seringue avec filtre Whatman en polyestersulfone) ont été mesurées. Les analyses des échantillons d'eau et des éluats de DGT ont été réalisées par les mêmes techniques que les minéralisats de gammares. La limite de quantification (LQ) du Cd en AAS est de 0,09 µg.L^{-1}. Les concentrations en métaux dans l'eau n'ont pas été analysées pour le prélèvement de janvier 2007 à Mareil-sur-Mauldre suite à une erreur dans la constitution des séquences d'analyse.

Les mesures physico-chimiques suivantes ont été faites : pH, conductivité, température, concentration en carbone organique dissous (COD), en carbone organique particulaire (COP), en chlorophylle A, et en ions majeurs (NO_3^-, Ca_2^+, Mg_2^+, Na^+, K^+, Cl^-, HCO_3^-, SO_4^{2-}). Enfin, en complément de ces campagnes, nous avons analysé de manière ponctuelle la contamination des métaux dans les feuilles consommées par les gammares aux deux sites (en avril à Vicq et en mai à Mareil-sur-Mauldre). Les feuilles, qui comportaient des traces caractéristiques de déchiquetage par les invertébrés, ont été prélevées au sein de deux substrats (sédiments fins et graviers d'environ 1 cm) et nous avons distingué l'amont de l'aval du rejet d'eau de ruissellement routier à Mareil-sur-Mauldre. Rapportées au laboratoire dans des tubes en plastique fermés, les feuilles ont été rincées à l'eau distillée, séchées, pesées puis minéralisées (par minéralisation à froid) afin de mesurer leurs teneurs en Cd par AAS ou ICP-AES selon les échantillons. La LQ du Cd en ICP-AES est de 1 µg.L^{-1} ce qui correspond à environ

0,5 µg.g^{-1} de Cd foliaire.

IV.2.2 Résultats

IV.2.2.1 Qualité physico-chimique de l'eau

Le pH, la conductivité et les concentrations en carbone organique particulaire (COP) sont similaires aux deux stations cf. Tableau 11. À Mareil-sur-Mauldre, l'eau est plus minéralisée qu'à Vicq, notamment en calcium, et contient davantage de chlorophylle A.

	$[Ca^{2+}]$	COD	COP	ChlA	pH	Cond.
	mg.L^{-1}	mg.L^{-1}	mg.L^{-1}	µg.L^{-1}		µS.cm^{-1}
Mareil-sur-Mauldre	113	7,7 ± 3	3,5 ± 1,9	8,6 ± 2,42	8,0 ± 0,3	770 ± 171
Vicq	78	9.2	2	1,8	7,8	710

Tableau 11 Paramètres de qualité des eaux aux deux stations. Moyenne sur huit données (Mareil-sur-Mauldre) et prélèvement d'avril 2007 (Vicq). Abrev. : Carbone Organique Dissous (COD) et Particulaire (COP), Chlorophylle A (ChlA), Conductivité (Cond.).

IV.2.2.2 Concentrations en métaux dissous, totaux, labiles et teneurs dans les feuilles

Métaux dissous et totaux

En Cu, Ni et Zn, les concentrations dissoutes et totales sont présentées à la Figure 44. Nous n'observons pas de tendance annuelle dans les variations de ces concentrations, sauf en Zn total où elles diminuent de manière significative (ANOVA, $p=0,0015$) en fonction du temps de 50 à 40 µg.L^{-1}. Il est possible que cette diminution soit imputable à une amélioration de la propreté des analyses vis-à-vis du Zn au fur et à mesure des campagnes. De plus, nous n'observons pas de contraste amont-aval des concentrations en Cu, Ni et Zn dissous.

Les concentrations en Cd de la fraction totale et dissoute de l'eau des deux sites sont inférieures à la LQ. Notons que la concentration détectable en Cd par AAS est de 0,030 µg.L^{-1}. Du Cd n'a été détecté dans la fraction totale à Mareil-sur-Mauldre que pour un faible nombre d'échantillons (15%), en revanche dans le Lieutel à Vicq, il en a été détecté dans les deux fractions du prélèvement (totale et dissoute).

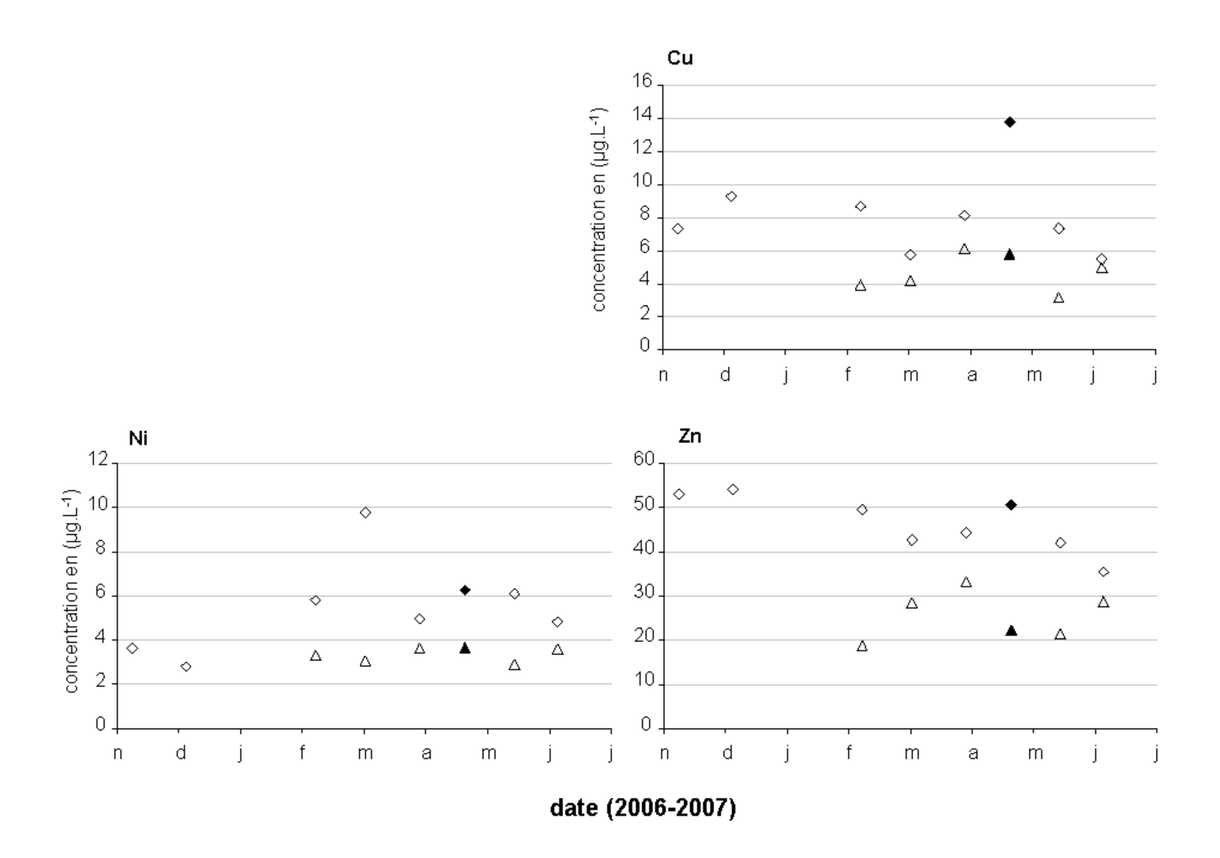


Figure 44 Concentrations (µg.L^{-1}) en Cu total, Ni total et Zn total (◇) et dissous (△) dans la Mauldre à Mareil-sur-Mauldre (site aval, marques vides) et dans le Lieutel à Vicq (site amont, marques pleines).

Concentrations en métaux labiles

A Mareil-sur-Mauldre, les concentrations en Cu labile, Ni labile et Zn labile sont variables au cours de l'année où des facteurs respectivement 4, 3 et 5 existent entre les extrema, cf. Figure 45. La concentration en Ni labile est significativement plus faible à Vicq qu'à Mareil-sur-Mauldre, ce que l'on ne retrouve pas dans les concentrations en Cu et Zn labiles. La plupart des concentrations en Cd labile sont inférieures à la limite de quantification de la méthode, il n'est donc pas possible d'en déterminer la variabilité. Les concentrations labiles en Cd sont inférieures à la LQ aux deux stations en mai 2007, ce qui empêche aussi de conclure sur un éventuel contraste amont-aval en Cd labile.

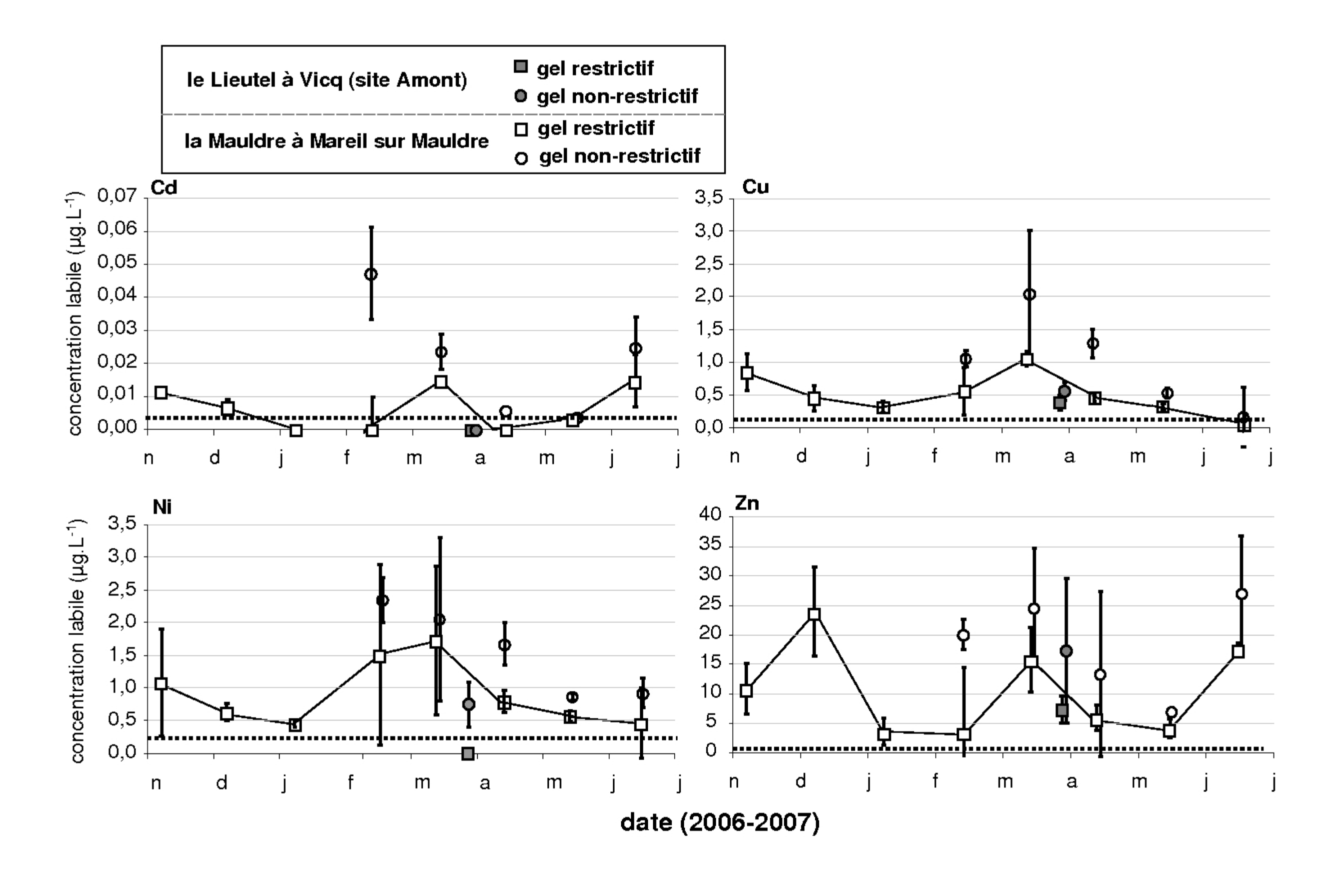


Figure 45 Concentrations en métaux labiles aux sites de la campagne Mauldre (en µg.L^{-1}). Les barres en pointillées marquent les limites de détection (Cd : 0,03 µg.L^{-1}, Cu : 0,15 µg.L^{-1}, Ni : 0,24 µg.L^{-1}, Zn : 0,06 µg.L^{-1}). Seules les concentrations en métaux labiles mesurées par DGT avec gel restrictif à Mareil-sur-Mauldre ont été mesurées systématiquement (carrés vides), elles sont reliées par les traits noirs.

Les concentrations en Cd, Cu et Zn labiles mesurées par les DGT-NR sont supérieures à celles mesurées par les DGT-R et cette différence n'est pas significative concernant le Ni. Les gels restrictifs limitent la diffusion des complexes de taille supérieure à quelques nm (la taille de pore du gel étant inférieure au nm (Zhang et Davison, 2000)), ceux dont le métal participe à la concentration labile. On pouvait donc s'attendre à ce résultat (sauf pour le Ni). En comparant les trois concentrations, dissoutes ([D]), labile en gel R ([R]) et labile en gel NR ([NR]), l'interprétation de la spéciation des métaux suivante est faite :

- Pour le Zn, [D] et [NR] sont proches et bien supérieures à [R]. On retrouve une telle différence entre [NR] et [R] dans le cas du Cd à Mareil-sur-Mauldre. Cette différence marquée entre [NR] et [R] montre qu'une partie de la concentration dissoute est composée de complexes métalliques de grande taille. Les substances humiques, par exemple, joueraient un rôle prédominant dans la spéciation de ces métaux. Cette

hypothèse a été précédemment formulée (et en partie vérifiée) par Meylan et al. (2004) dans son étude de la spéciation du Zn de la rivière Furbach.

- Pour le Cu, [D] est environ deux fois supérieure à [NR], elle-même environ deux fois supérieure à [R]. Le cuivre de la fraction dissoute est donc complexé à la fois par des molécules dont les complexes ne sont pas labiles ([D]> [NR], et la même proportion de [NR]:[D] a été mesurée par Meylan et al. (2004)), ainsi que par des complexes métalliques de grande taille, labiles uniquement pour des DGT non-restrictives ([NR]> [R]). Notons que Tusseau-Vuillemin et al. (2007) trouvent, en Seine, un rapport entre [R] et [D] similaire à celui de cette étude (entre quatre et six).

- Pour le Ni, les trois concentrations sont proches. Cela tend à montrer que la spéciation du Ni par les matières organiques est faible et qu'une partie importante de la concentration en Ni dissous est sous forme inorganique ou liée à de petites molécules organiques dont les complexes sont labiles. On ne retrouve pas cette observation dans l'étude d'Unsworth et al. (2006) qui porte sur plusieurs eaux douces naturelles : dans cette étude, le Ni a certes tendance à être moins complexé par les acides humiques et fulviques que les autres métaux, mais [NR] est plutôt de l'ordre de la moitié de [D].

Teneur dans les feuilles

Les teneurs en Cd mesurées dans les feuilles sont présentées Figure 46. Les feuilles vertes consommées par les gammares en bordure de rivière à Vicq contiennent moins de Cd que les feuilles en décomposition. Nous n'avons pas retrouvé de telles feuilles à Mareil-sur-Mauldre. Les teneurs en Cd des feuilles en décomposition aux deux sites ne sont pas statistiquement différentes (Wilcoxon, p=0,2286). L'ensemble des feuilles contenait 0,57±0,37 $\mu g.g^{-1}$ de Cd. On remarque donc que ces teneurs sont variables selon le type de feuille (en décomposition ou non) mais ne le sont pas selon le substrat ou le site.

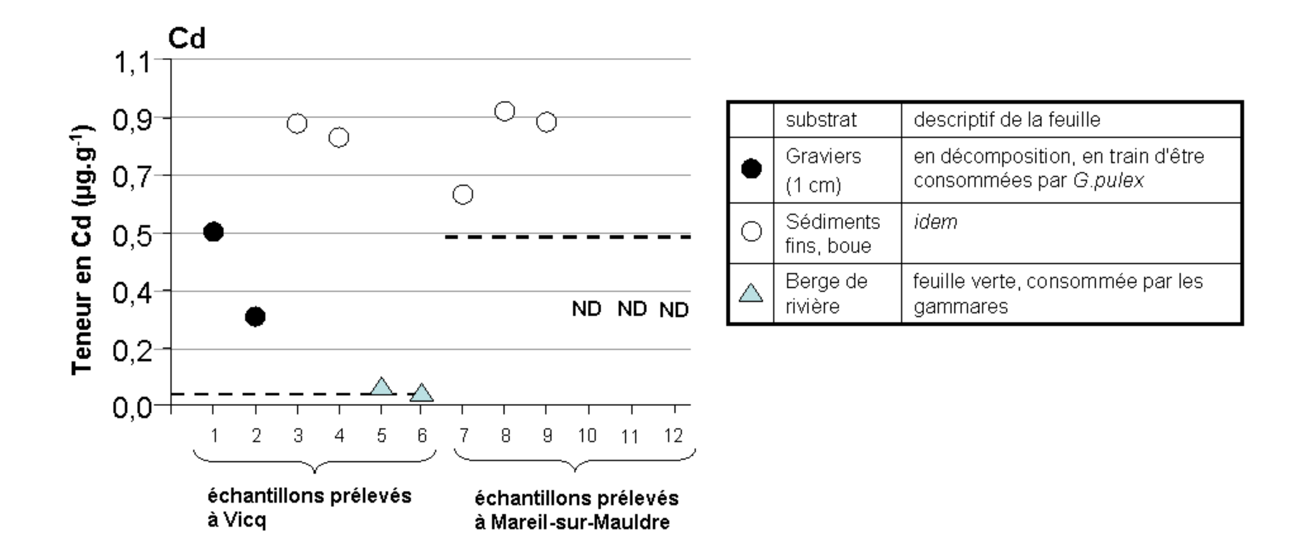


Figure 46 Teneurs en Cd des feuilles ($\mu g.g^{-1}$) consommées par les gammares sur le site du Lieutel à Vicq et de la Mauldre à Mareil-sur-Mauldre. Les barres en pointillées indiquent les limites de quantification : deux méthodes d'analyse ont été appliquées (AAS pour les feuilles de Vicq et ICP-AES pour celles de Mareil-sur-Mauldre). Abrev. ND ; valeur non determinée.

IV.2.2.3 Bioaccumulation

A Mareil-sur-Mauldre, les moyennes annuelles des teneurs en Cd des *G. pulex* sont de 0,072 ± 0,049 $\mu g.g^{-1}$ (n=61), en Cu de 99 ± 10 $\mu g.g^{-1}$ (n=57), en Ni de 1,56 ± 0,57 $\mu g.g^{-1}$ (n=56) et en Zn de 68 ± 10 $\mu g.g^{-1}$ (n=57). La variabilité des teneurs en Cd, dont l'écart-type représente 68% de la teneur moyenne, est plus grande que celle des autres métaux (36% pour le Ni et environ 10% pour Cu et Zn). Le fait que les teneurs en Cu et Zn ne varient que peu, alors que celles en Ni et Cd varient, représente une validation de notre méthode de mesure du suivi des métaux dans les gammares sur les plans du nombre d'individus prélevés et de préparation et de l'analyse des échantillons.

La variabilité des teneurs en Cd peut être imputée à leur proximité avec la limite de quantification. Cette teneur subit une légère variation saisonnière en hiver, cf. Figure 47 : elle s'est élevée à 0,120 $\mu g.g^{-1}$ en novembre et décembre 2006 pour décroître à partir de février 2007 autour de 0,060 $\mu g.g^{-1}$. Les causes de cette variation saisonnière sont difficiles à établir. En première hypothèse, la variation semble calée sur le cycle reproducteur des gammares. La proportion de femelles fécondées et portant des œufs chute en début d'automne à cause de la baisse des températures et se rétablit fin janvier lorsque la photo-période change (Alouf, 1983). Cette hypothèse est évoquée dans l'étude de Geffard et al.

(2007) qui met en évidence une augmentation hivernale de la concentration en protéines de type métallothionéine des *G. pulex* qui pourrait être liée à leur cycle reproducteur. Néanmoins, la chronique sur une année des teneurs en Cd des *G. pulex* de cette même étude ne montre pas d'augmentation hivernale.

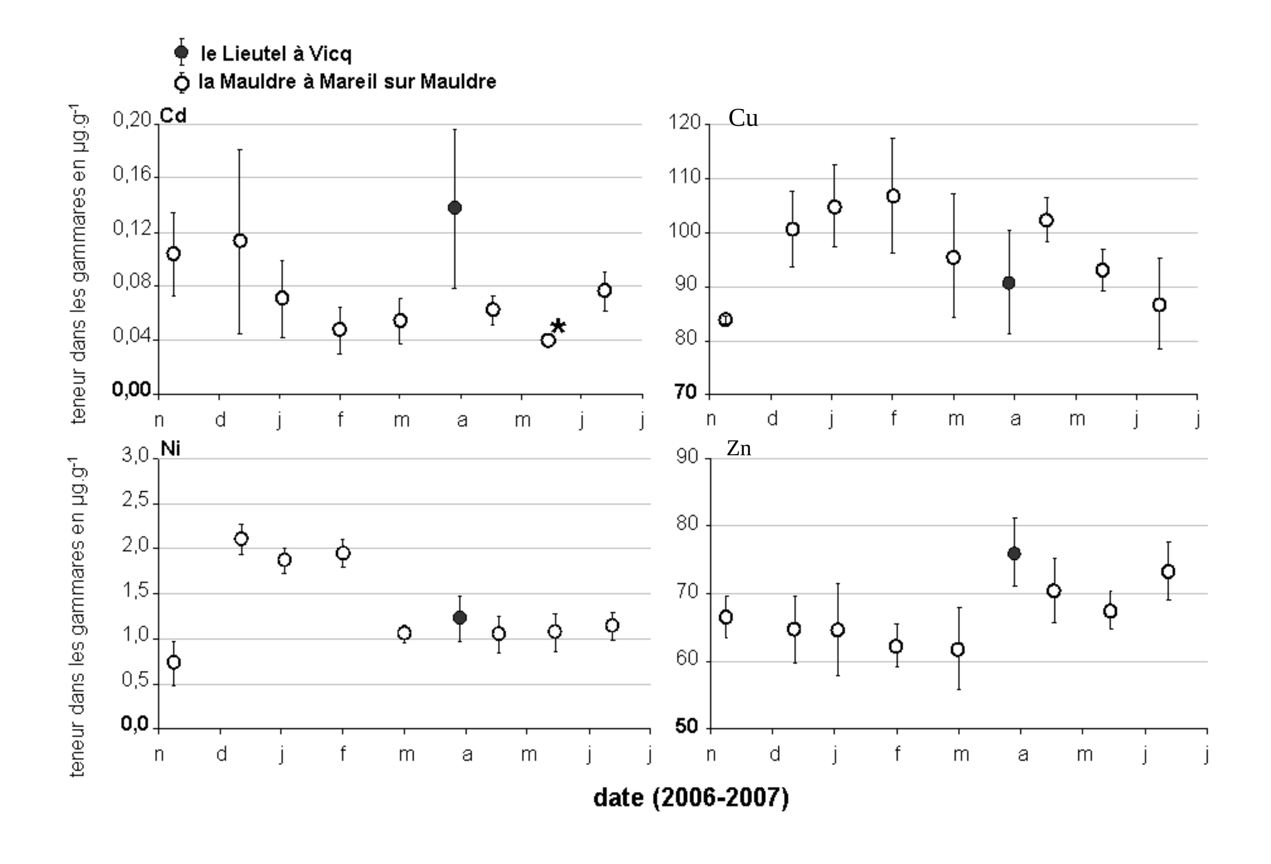


Figure 47 Chronique annuelle des teneurs en Cd, Cu, Ni et Zn dans les gammares ($\mu g.g^{-1}$) à Mareil-sur-Mauldre (ronds vides) et Vicq (ronds pleins). Moyenne ± E-T. * Les teneurs en Cd de sept échantillons sur neuf du prélèvement de mai 2007 sont en dessous de la LQ correspondante à environ 0,045 $\mu g.g^{-1}$ de Cd. Pour les autres métaux les analyses sont au-dessus des LQ.

Nous observons en revanche une stabilité des teneurs en Cu et Zn au cours de la période étudiée. La teneur en Ni des gammares est significativement différente entre les périodes [décembre-février] où la teneur est d'environ 2 $\mu g.g^{-1}$ et [mars-juillet] durant laquelle elle est de 1 $\mu g.g^{-1}$. Aucune tendance observable dans les concentrations en Ni de l'eau ne peut expliquer cette diminution. Nous pouvons donc seulement l'imputer (c'est une hypothèse) à un changement de population des gammares. Les gammares pourraient avoir subi une dérive catastrophique vers l'aval lors des crues de fin février 2007, cf. Figure 48. Notons qu'aucun décrochage similaire n'est observé à la même période dans les teneurs en Cu, Zn et Cd, ce qui n'est pas nécessairement contradictoire avec l'hypothèse d'un changement de

population du fait de la constance des teneurs dans les gammares en ces métaux, à des niveaux qui semblent essentiels (Cu, Zn) ou très bas et de l'ordre du bruit de fond (Cd).



Figure 48 Chronique des débits journaliers (courbe bleu) de la Mauldre à Aulnay-sur-Mauldre (station hydrométrique) extraite du bulletin de situation hydrologique fin mars 2007 (http://www.ile-de-france.environnement.gouv.fr/docenconsult/bulletins%20hydro/). Les autres courbes représentent les valeurs statistiques des débits à cette station : le débit médian (cyan), le débit quinquennal sec (rouge) et le débit quinquennal humide (noir). Le début de l'hiver 2006-2007 fut marqué par une période de faibles débits (inférieurs aux débits quinquennaux secs).

La teneur moyenne en Cd des gammares à Vicq est significativement supérieure à celle de la Mauldre à Mareil-sur-Mauldre en avril 2007 (test de Student hétéroscédastique, *p*= $2{,}4.\ 10^{-7}$). Cette différence (+ 121%) est surprenante puisque nous avions choisi la station de Vicq comme possible référence (moins contaminée). En revanche les teneurs en Zn, Cu et Ni ne sont pas statistiquement différentes aux deux sites.

Nous observons donc une différence de teneurs en Cd dans les gammares entre les sites sans qu'il y ait de différence notable entre les contaminations des feuilles et il est difficile d'en déterminer la cause sans connaître les contaminations en Cd de l'eau aux deux sites. Notons que les teneurs en Cd sont inférieures au site où la concentration en calcium est la plus forte. Le rapport des taux d'entrée par voie dissoute calculés aux deux sites, en fonction de [Ca^{2+}] suivant le modèle développé à la Partie 2, est de +27% (Vicq par rapport à Mareil-sur-Mauldre). En supposant une biodisponibilité du Cd égale aux deux sites, la différence de dureté calcique de l'eau n'explique donc qu'en partie le contraste entre les sites des teneurs en Cd des gammares.

Enfin, nous avons appliqué le modèle biodynamique du Cd à partir des données précédentes afin de valider sa pertinence. Nous considérerons qu'un état stationnaire de la teneur en Cd

est plausible si des teneurs constantes sont observées sur une durée supérieure à vingt-deux jours, ce temps étant le temps caractéristique du phénomène de dépuration des gammares en Cd (Pellet et al., 2008). Ainsi, entre février 2007 et juillet, l'état stationnaire (Cd) est vérifié à Mareil-sur-Mauldre, où nous appliquons le modèle. La prévision de la teneur en Cd des gammares à l'état stationnaire, notée $[Cd]_{org}^{SS}$, est la somme des contributions par voie dissoute et par voie trophique selon l'Équation 23 :

Équation 23

$$[Cd]_{org}^{SS} = \frac{k_u.[Cd]}{k_e} + \frac{AE.IR.[Cd]_f}{k_e}$$

Nous avons supposé la concentration en Cd biodisponible ([Cd]) égale à la concentration en métal labile (DGT-R) en mars de 0,015 $\mu g.L^{-1}$. Nous avons également considéré :

- un taux d'entrée k_u égal à 0,32 $L.g^{-1}.j^{-1}$, tenant compte de la dureté calcique, et un taux d'élimination k_e de 0,032 j^{-1},
- une hypothèse de contamination moyenne des feuilles à 0,5 $\mu g.g^{-1}$,
- un taux de nutrition de 0,1 $g.g^{-1}.j^{-1}$ sur la base de la température de l'eau et de la relation établie par Matlby et al. (2002) entre ce paramètre et la température,
- une efficacité d'assimilation par voie trophique de 23%.

Cette application du modèle prévoit une teneur de 0,53 $\mu g.g^{-1}$ de Cd dans les gammares ; cette prévision se décompose en 0,15 $\mu g.g^{-1}$ par voie dissoute et 0,38 $\mu g.g^{-1}$ par voie trophique. Or la teneur en avril (moyenne aux deux sites) est de 0,09 ± 0,06 $\mu g.g^{-1}$ de Cd. Le modèle surestime donc d'un facteur cinq la teneur en Cd des gammares. La prévision de bioaccumulation à l'état stationnaire par voie dissoute seule ne surestime que peu l'observation (moins du double). Concernant la voie trophique, il semble peu probable que le taux d'ingestion soit la cause de la surestimation car il n'a pas été choisi élevé, et ce, en tenant compte de la température de l'eau et du type de feuille. La surestimation de la prévision par cette voie proviendrait donc plutôt du choix de la contamination des feuilles. Il est plausible (suivant nos observations, notamment la consommation de feuilles

vertes immergées au site de Vicq) que les gammares sélectionnent des feuilles moins contaminées en Cd en moyenne que celles prélevées.

IV.2.3 Conclusions

Les *G. pulex* autochtones accumulent des quantités de Cd, Cu, Ni et Zn suffisantes pour faciliter la mesure et le suivi de la présence des métaux dans le milieu aquatique. Dans le contexte de cette étude, où la contamination métallique du milieu aquatique est basse et chronique, seules les teneurs en Cd et Ni présentent des variations dans le temps (et entre les sites en Cd) susceptibles de fournir des informations en lien avec la contamination du milieu aquatique. Les teneurs en Cu et Zn sont constantes dans le temps et ne reflètent pas les variations des concentrations en Cu et Zn labiles observées. Nos résultats ne sont pas incompatibles avec l'hypothèse d'une influence inhibitrice du calcium sur la bioaccumulation du Cd par les gammares. En revanche, le modèle biodynamique tend à surestimer la teneur en Cd des gammares sur la base de la concentration en métal labile dans l'eau et de la contamination moyenne des feuilles prélevées aux deux sites. La contamination des feuilles est très variable selon le type de feuille alors même que la voie trophique contribue de façon majoritaire à la prévision, il serait donc pertinent d'améliorer la connaissance de la contamination des feuilles en Cd et de la nourriture sélectionnée par les gammares pour parvenir à une validation du modèle biodynamique dans un tel contexte (faible contamination chronique du milieu aquatique).

Enfin, la variabilité saisonnière des teneurs en Cd et Ni est de l'ordre d'un facteur deux. Ceci implique qu'il est, en toute rigueur, préférable de comparer des teneurs en ces métaux que pour des échantillons prélevés à des dates proches (même mois), où alors de ne comparer qu'en ordre de grandeur les teneurs de deux échantillons prélevés à des mois quelconques de l'année. Les causes des variations dans le temps des teneurs en Cd et Ni restent à établir, notamment l'hypothèse selon laquelle une crue pourrait renouveler la population des gammares et modifier la teneur observée en un site.

IV.3 TENEURS METALLIQUES DANS LES GAMMARES AUTOCHTONES A DIFFERENTES

STATIONS DU BASSIN VERSANT SEINE-NORMANDIE

Notre dernier objectif a été d'examiner l'hypothèse qu'il existe des contrastes entre les sites dans les teneurs métalliques des *G. pulex* à l'échelle du bassin-versant. Nous avons aussi cherché à relier la variabilité de ces teneurs aux conditions physico-chimiques de chaque site. Il s'agit d'une étape supplémentaire dans le cadre du développement d'un outil de biosurveillance du milieu aquatique. Aussi, l'intérêt de modéliser la teneur en métaux dans les invertébrés aquatiques en fonction des conditions d'exposition est d'autant plus grand que ces teneurs sont contrastées entre différents sites, leur "*pouvoir de résolution*" entre les sites étant alors meilleur (Fialkowski et Rainbow, 2006).

IV.3.1 Matériel et méthodes

Quarante-trois échantillons de gammares en provenance de différentes stations du bassin Seine-Normandie ont été prélevés et réservés pour cette étude par les prestataires de l'Agence de l'eau Seine Normandie lors des campagnes de mesure de l'indice biologique global normalisé effectuées du mois d'avril au mois d'août 2007, cf. . Tableau 13 (en annexe). Ces échantillons contenaient une trentaine de gammares (entre 9 et 51 selon les échantillons), de taille adulte (11,4 mm ± 0,2, n=35), le plus souvent légèrement séchés après prélèvement à l'aide d'une serviette jetable, et conditionnés dans des piluliers en plastique ou des sacs en plastique fermés. Seuls les échantillons (*n*=35) composés de *G. pulex* ont été traités, la détermination taxonomique a été réalisée à l'aide de la clef de reconnaissance proposée par Felten (2003). La taille des gammares a été mesurée par analyse d'image après photographie de l'échantillon, puis les gammares ont été échantillonnés par groupe d'une dizaine de gammares. Ces échantillons ont été séchés à l'étuve (45°C, 48h), pesés poids sec, puis minéralisés par le protocole de minéralisation à froid déjà décrit au paragraphe II.2.1. La détermination des concentrations en Cu, Ni et Zn dans les minéralisats a été réalisée en ICP-AES et celle en Cd par AAS-four.

Nous avons utilisé la base de données de l'agence de l'eau Seine-Normandie de la contamination en micropolluants en 2007 (nommée ci-après "données micropolluants") sur les stations des réseaux de contrôle physico-chimique des cours d'eau du bassin versant

Seine-Normandie[17]. L'ensemble des trente-cinq stations où des *G. pulex* ont été analysés est appelé : jeu de stations "*gammares*".

Afin de pouvoir relier la variabilité des teneurs en Cd aux différentes duretés calciques de l'eau, nous avons supposé que la voie trophique de bioaccumulation dépende de [Ca^{2+}] avec la même loi que celle proposée pour la voie dissoute. Ceci est plausible dans la mesure où il a été montré que, chez la daphnie, la voie trophique de contamination en Cd est influencée par la dureté calcique de l'eau d'une façon similaire à la voie dissoute (Tan et Wang, 2008). L'Equation 24 nous permet alors de tenir compte de l'influence du calcium sur la teneur en Cd à l'état stationnaire. Elle est basée sur l'équation 8 (avec un taux de croissance individuelle g nul) et utilise l'expression d'une efficacité d'assimilation du Cd à la limite des très faibles concentrations en calcium, notée $AE_{(0)}$:

Équation 24

$$C_a = \frac{k_{u(0)}.[Cd] + AE_{(0)}.IR.[Cd]_{feuilles}}{k_e.(1+\frac{[Ca]}{K_{Ca}})}$$

Suivant ce modèle et pour mettre en évidence une éventuelle influence de la concentration en calcium sur la bioaccumulation du Cd chez *G. pulex*, les teneurs en Cd ont été normalisées en les multipliant par un facteur *n* calculé selon l'Équation 25. Cette équation est dérivée de l'Équation 15 en faisant le rapport entre le taux d'entrée par voie dissoute à la dureté calcique du site sur celui à [Ca^{2+}]=100 $mg.L^{-1}$.

[17] Nous remercions Fabrice Martinet (à l'Agence de l'Eau Seine-Normandie) de nous avoir transmis ces données.

Équation 25

$$n = \frac{1 + \frac{100}{K_{Ca}}}{1 + \frac{[Ca^{2+}]}{K_{Ca}}}$$

où $[Ca^{2+}]$ est la concentration en calcium, K_{Ca} est la constante d'inhibition par le calcium (50 $mg.L^{-1}$). Cette normalisation équivaut à calculer une teneur théorique dans les gammares à chaque site telle qu'elle serait si $[Ca^{2+}]$ était partout égale à 100 $mg.L^{-1}$, et moyennant l'hypothèse que la teneur bioaccumulée dépend de $[Ca^{2+}]$ suivant la même relation que celle trouvée pour le taux d'entrée par voie dissoute.

IV.3.2 Résultats

IV.3.2.1 Teneurs métalliques dans les gammares

A l'échelle du bassin versant, les teneurs moyennes en Cd, Cu, Ni et Zn sont indiquées Figure 49. La grande variabilité des teneurs métalliques en Cd dans les gammares autochtones s'explique du fait de son caractère non-essentiel d'une part, son niveau pouvant être en dessous de la LQ (à une station) ou très bas (minimum de 0,030 $\mu g.g^{-1}$) et d'autre part en raison de la présence de sites où les gammares autochtones sont contaminés en Cd dans le bassin versant (maximum = 0,71 $\mu g.g^{-1}$).

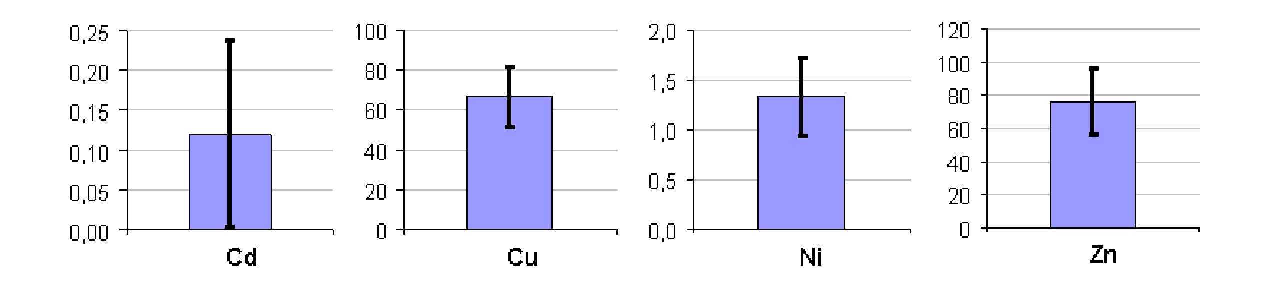
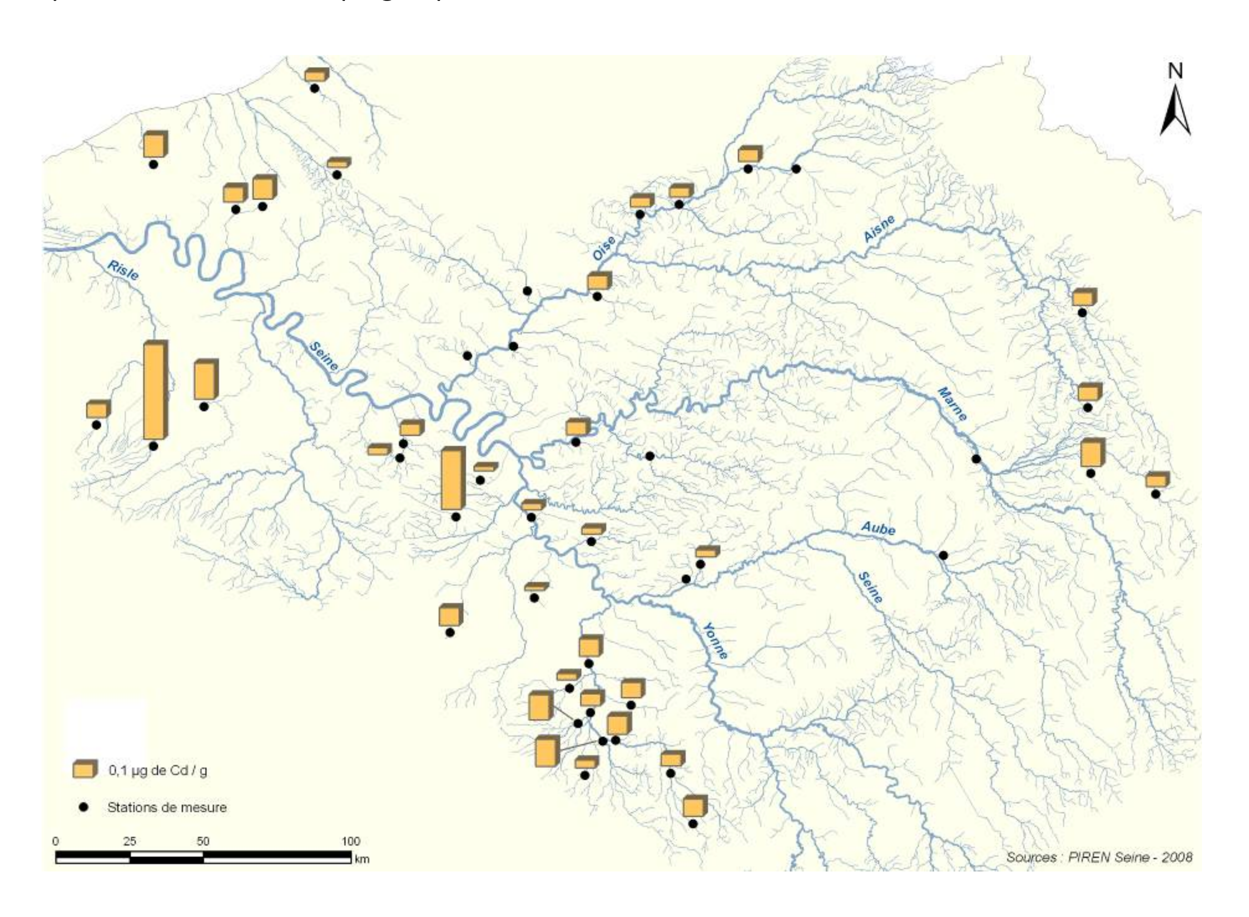


Figure 49 Teneurs métalliques (ordonnées) en $\mu g.g^{-1}$ dans les gammares autochtones à l'échelle du bassin versant, moyenne ± SD (n=34 pour Ni, n=35 pour Cd, Cu, Zn).

Les stations sont distribuées dans tout le bassin versant, cf. Figure 50. Les stations où des gammares étaient abondants ont été privilégiées par les agents préleveurs. Leur distribution spatiale est donc davantage représentative de la présence des gammares que de la

contamination du milieu aquatique. D'autre part, on notera que la distribution n'est pas homogène, certains grands cours d'eau, par exemple, étant exclus (l'Yonne, la Seine) ou quasiment (la Marne, une seule station) alors que dix stations sont regroupées en tête du bassin versant du Loing (dans le Loiret, groupe au sud de la carte, Figure 50). Peu de stations sont à l'aval des cours d'eau de la conurbation parisienne (Paris et grande banlieue), mais cette distribution n'est pas pour autant caractéristique des cours d'eau de faible ordre de Strahler (les plus en amont). L'Oise, par exemple, est couverte par quatre stations, de sorte que l'influence de Compiègne peut être mise en évidence.



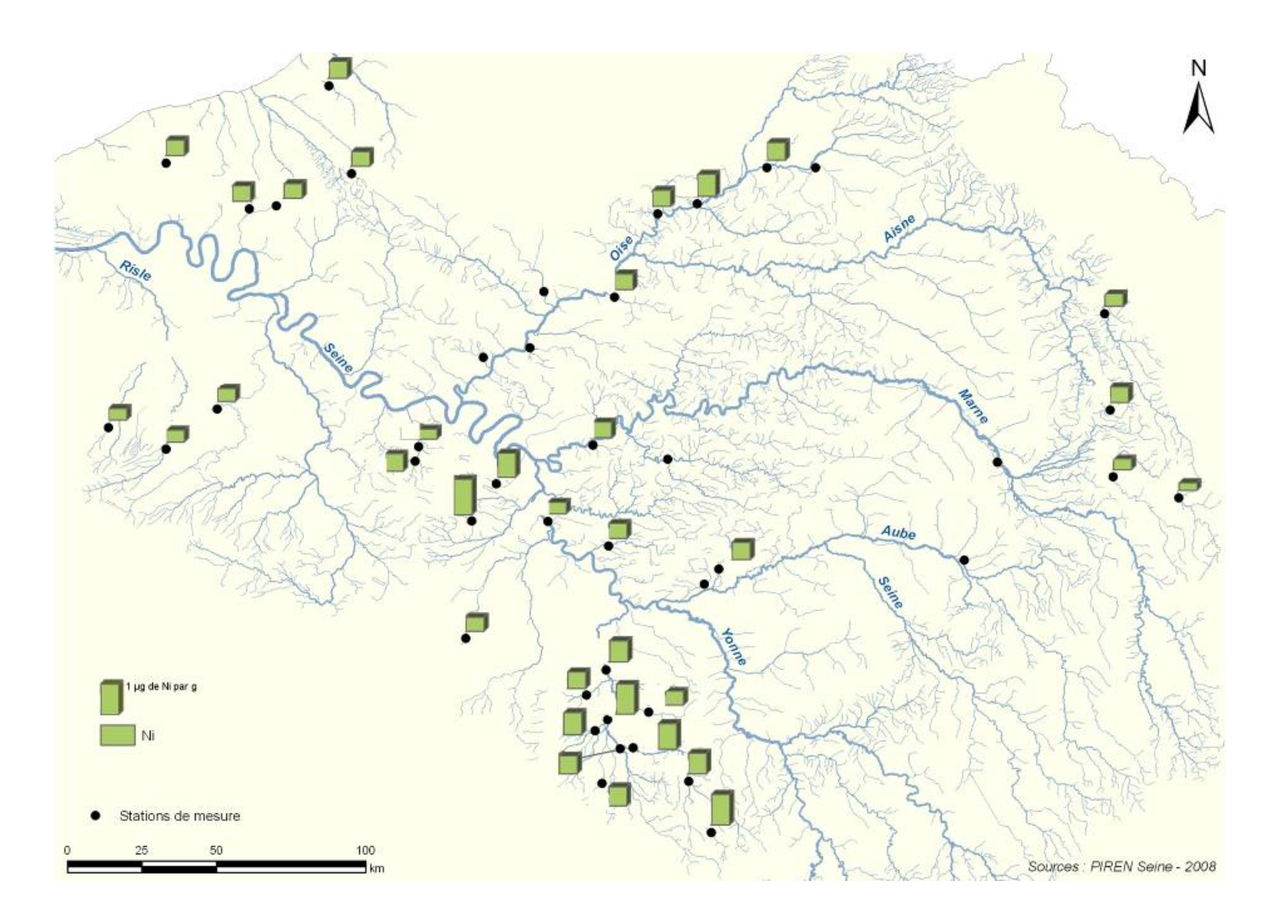


Figure 50 Cartes des teneurs en Cd et en Ni ($\mu g.g^{-1}$) des *G. pulex* autochtones du bassin-versant Seine-Normandie (district administratif). Nous remercions Marie Sylvestre (Webmaster au Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine) pour la conception graphique de ces cartes.

Nous indiquons à la Figure 51 les teneurs en Cd, Cu et Ni à toutes les stations. Les teneurs en Cd ne sont pas corrélées à celles du Cu (coefficient de corrélation r^2 de 0,295), ni celles en Cd et en Ni (r^2 de 0,186).

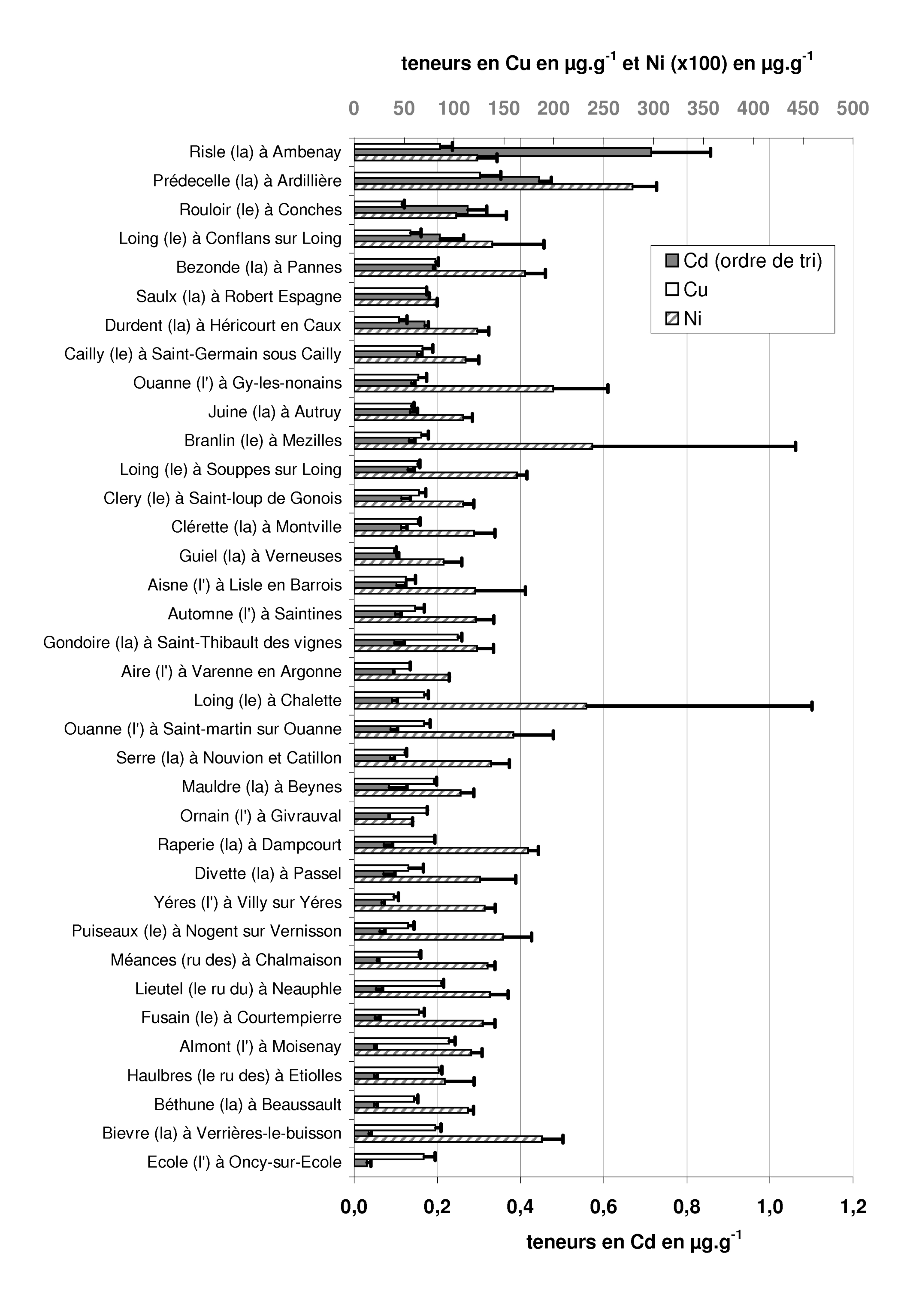


Figure 51 Teneurs en Cd, Ni et Cu des G. pulex autochtones sur trente-six stations du bassin versant Seine-Normandie. Les stations sont classées par teneurs décroissantes en Cd. La station "Prédecelle (la) à Ardillère" a été ajoutée au jeu de données. La teneur en métaux des gammares de cette station n'a pas été prise en compte lors du calcul des contaminations moyennes de la Figure 49. L'écart type (Cd) indique la variabilité entre les cinq à sept échantillons analysés pour chaque site.

En résumé, nous mettons en évidence l'existence de contrastes entre les sites dans les teneurs en Cd des gammares autochtones ainsi qu'une absence de contrastes en Cu et Zn.

Les teneurs en Ni sont assez variables (un facteur 5 entre les extrema) bien qu'elles ne couvrent pas plusieurs ordres de grandeurs comme celles en Cd.

IV.3.2.2 Effet du calcium sur les teneurs en Cd

Hormis aux deux sites où $[Ca^{2+}]$ atteint un extremum (23 et 160 $mg.L^{-1}$) les teneurs en Cd normalisées à un effet du calcium à 100 $mg.L^{-1}$ sont proches des teneurs mesurées (12% de différence en moyenne sur l'ensemble), cf. Figure 52.

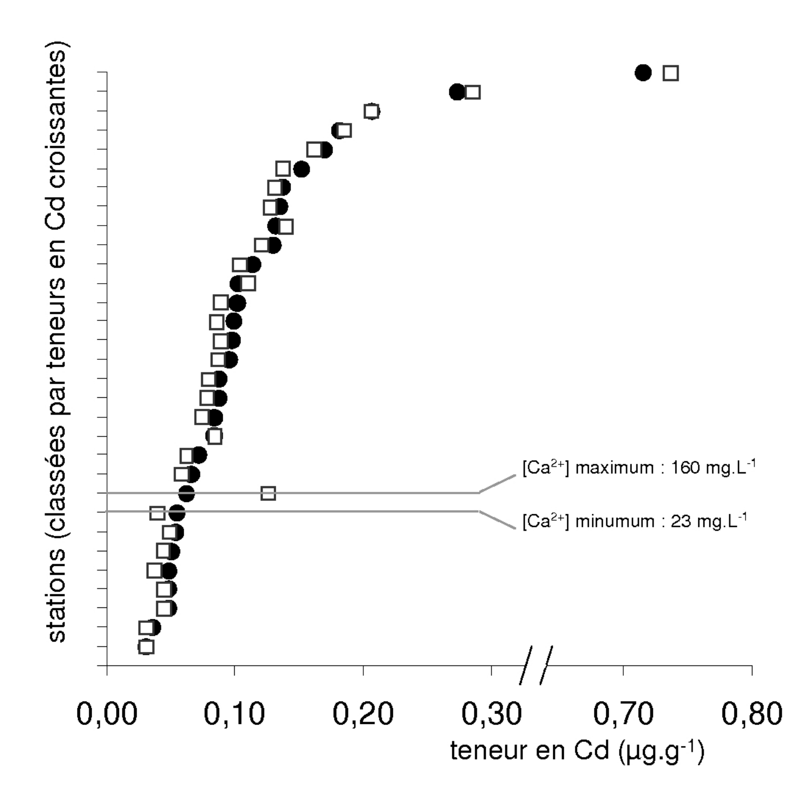


Figure 52 Simulation de l'effet du calcium sur les teneurs en Cd des gammares aux différentes stations. Comparaison entre les teneurs en Cd mesurées (ronds pleins) et les teneurs normalisées à une concentration en calcium de 100 $mg.L^{-1}$ (carrés vides). Si les variations de concentrations en calcium devaient avoir une influence sur les teneurs en cadmium (via la simulation), les deux distributions formées par les points pleins et les carrès vides devraient ne pas se superposer.

Les teneurs normalisées ne sont pas plus basses que les teneurs observées aux sites où ces dernières sont maximales. Ainsi, l'effet du calcium sur la biodisponibilité du Cd par voie dissoute n'est pas en jeu dans la distribution observée de la contamination de ces gammares. Le même raisonnement vaut pour les sites où les gammares sont le moins contaminés en Cd : leurs teneurs basses ne sont pas le fait d'une forte dureté de l'eau. Nous n'observons donc pas d'effet de $[Ca^{2+}]$ sur la teneur bioaccumulée par les gammares

autochtones du bassin versant Seine-Normandie, ceci étant probablement lié à la faible variabilité de [Ca^{2+}] aux différentes stations (119 ± 20 $mg.L^{-1}$, n=31).

IV.3.2.3 Analyse des teneurs métalliques conjointement aux données de contamination du milieu aquatique

Nous avons cherché à mettre en relation les teneurs en Cd et en Cu dans les gammares avec les contaminations de l'eau issues de la base de données *"données micropolluants".* Cela n'a pas été possible en Cd, car les cinq stations où une concentration en Cd de l'eau a pu être quantifiée lors de la constitution de cette base de données ne correspondent pas à des stations *"gammares"* (elles sont dans l'axe Seine et sur la rivière Vaucouleurs). De plus, le même problème se pose dans le cas du Cu. A défaut de connaître les contaminations des eaux en Cd et en Cu, la base *"données micropolluants"* contient des données de contamination métallique du sédiment à certaines stations. Nous avons relié ces données (pour Cd, Cu, Ni et Zn) avec les stations *"gammares"*. Les contaminations métalliques du sédiment égales à la LQ de la méthode appliquée par le laboratoire d'analyse ont été écartées. Puis, parmi les stations *"gammares"*, nous avons trouvé pour chaque métal un jeu de stations correspondantes parmi les données de contamination des sédiments (32 stations se correspondent en Zn, 31 en Ni, 23 en Cu et 15 en Cd). La Figure 53 présente les graphiques de corrélation ou de non-corrélation entre la contamination du sédiment (en abscisse) et de la bioaccumulation par les gammares pour ces quatre métaux aux stations retenues.

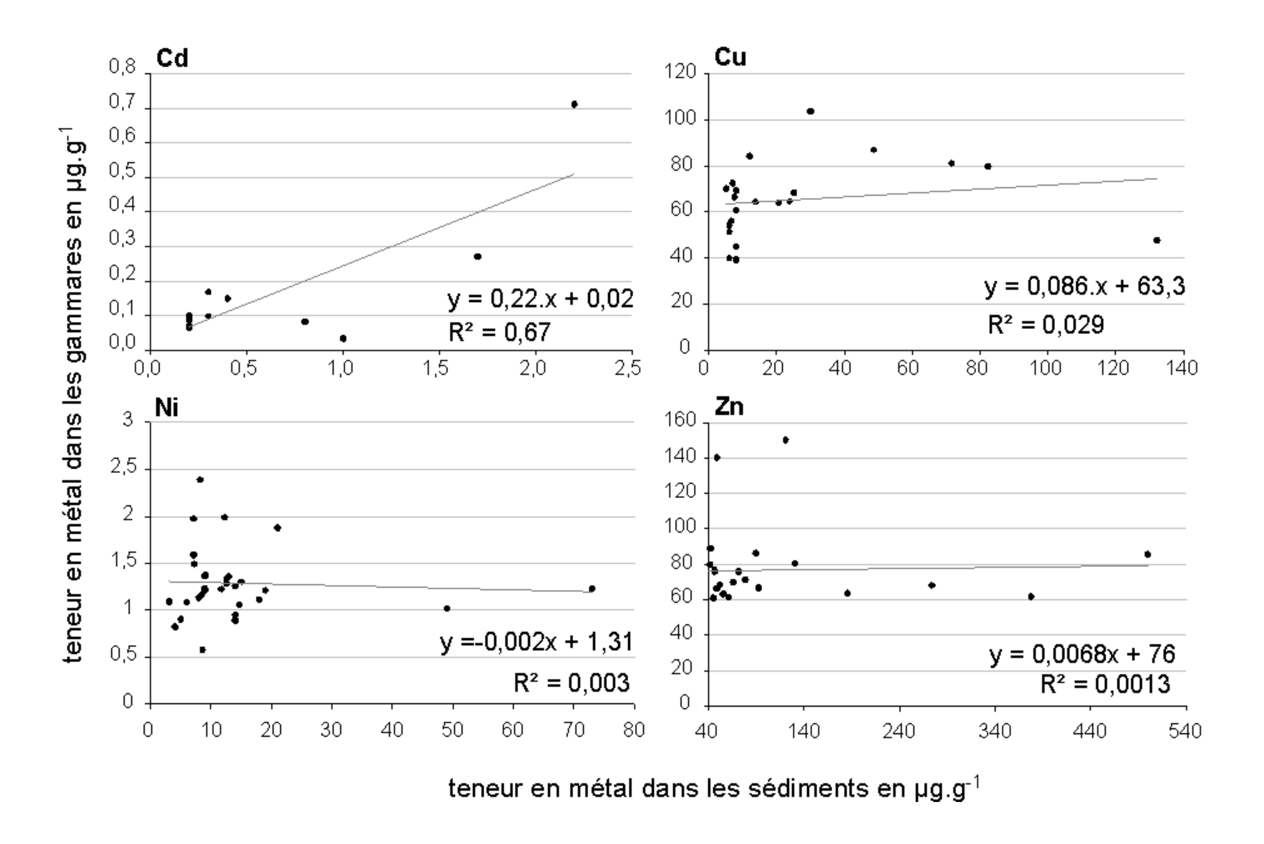


Figure 53 Graphiques de corrélation (ou non-corrélation) entre les teneurs en Cd, Cu, Ni et Zn mesurées dans les gammares ($\mu g.g^{-1}$) et les teneurs métalliques des sédiments ($\mu g.g^{-1}$) de la station correspondante

Pour le Cd, une corrélation significative apparaît entre la teneur bioaccumulée par les gammares et la teneur du sédiment (pente de 0,22 significativement différente de zéro, p= 7.10^{-4}). Cependant, le caractère significatif de cette relation ne se vérifie plus (pente de 0,07, p=0,06) si l'on retire du jeu de donnée la station où la contamination des gammares est maximale (la Risle à Ambenay). Nous en concluons qu'il n'y a pas de corrélation entre la teneur en Cd des gammares et celle des sédiments, ce qui est aussi le cas des autres métaux.

IV.3.2.4 Conclusion

Les teneurs en Cd (et dans une moindre mesure en Ni) sont assez variables entre les sites échantillonnés à l'échelle du bassin-versant pour qu'une relation puisse être faite avec des variations de biodisponibilité de ces métaux (ce que notre étude n'a pas pu faire). Il n'existe que de faibles contrastes entre les sites dans les teneurs en Cu et Zn. En conséquence, ces teneurs ne sont pas informatives sur l'état de contamination du milieu aquatique du bassin. Cette étude confirme donc l'hypothèse que les teneurs en Cu des gammares n'apportent une information pertinente que dans les cas de pollutions extrêmes (Fialkowski et al., 2003)

et mène à penser que c'est le cas pour le Zn aussi. Enfin, l'absence de corrélation entre les teneurs métalliques dans les gammares et le sédiment représente une validation de l'intérêt de la mesure des métaux (Cd et Ni) dans les gammares. Cette donnée n'est pas directement liée à la seule donnée de contamination chimique dont on peut disposer actuellement à l'échelle du bassin versant Seine-Normandie.

IV.4 Conclusions du chapitre

Notre première étude de terrain a montré que les teneurs en Cd et en Zn des gammares augmentent lorsque ces organismes sont transplantés vers des sites contaminés. De surcroît pour le Cd, nous avons validé la vraisemblance de prévisions établies sur la base des constantes du modèle biodynamique développé dans cette thèse. Nos résultats remettent en cause la simplicité du scénario d'exposition (voie dissoute seule) qui avait été envisagée lors des expériences de transplantation d'organismes en cage. La voie trophique de contamination représente donc encore un verrou pour l'interprétation des contaminations de gammares en métaux en conditions semi-contrôlées. Nous avons noté des variations des teneurs en Cu et Ni également lors de cette étude. Mais elles restent, dans le cas du Cu, d'une ampleur trop faible pour qu'il soit envisageable d'en tirer parti en tentant de la relier quantitativement aux différences de contamination du milieu (concentration dans l'eau et teneur dans la nourriture). Nous n'avons pas assez de données pour formuler la même conclusion dans le cas du Ni.

En second lieu, la méthode de mesure des métaux dans les gammares autochtones a été validée lors de l'étude sur la Mauldre. En revanche, le lien quantitatif entre les variations des teneurs en Cd (temporelles et entre les sites) et en Ni (temporelles) avec les variations de la contamination du milieu n'a pas pu être fait. En présence d'une contamination métallique basse et chronique de l'eau (en Cd, Cu, Ni et Zn) et des feuilles (en Cd), seules les teneurs en Cd et Ni (pas en Cu ou Zn) des *G. pulex* autochtones présentent des variations dans le temps susceptibles de fournir des informations pertinentes dans l'optique d'établir des liens avec la contamination du milieu aquatique. La difficulté de mesurer la concentration en Cd dans l'eau renforce l'intérêt de savoir interpréter la teneur en Cd des gammares et leurs variations, d'où il ressort que mesurer les teneurs dans cet invertébré bénéficierait au suivi

de la contamination du milieu à l'heure actuelle.

Enfin, à l'échelle du bassin versant, nous confirmons l’intérêt que présente la surveillance biologique des teneurs en Cd et Ni dans *G. pulex*, car des contrastes entre les sites sont mesurables pour ces métaux. En revanche, les teneurs en Cu et Zn des gammares autochtones sont peu variables entre les différents sites. En Cd et Ni, nous n’apportons pas d’éléments dévoilant les causes de la variabilité des teneurs des gammares entre les sites. L’interprétation de l’information sur la contamination du milieu aquatique qu’apporte cette surveillance biologique reste donc à fournir, ce qui devrait pouvoir être fait d’une part en couplant une telle étude à des mesures de Cd dans l’eau (sous forme dissoute et labile) et d’autre part en déterminant les apports par voie trophique.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Parmi les conséquences écotoxicologiques de la présence de microcontaminants dans le milieu aquatique, cette thèse s'est focalisée sur le processus de leur bioaccumulation chez l'invertébré d'eau douce *G. pulex*. Cette réponse biologique devait permettre de mettre en évidence les variations de la biodisponibilité de ces substances en fonction des qualités physico-chimiques du milieu aquatique.

Sur la voie dissoute de contamination en microcontaminants

Dans une eau minérale et par modification des conditions d'exposition par voie dissoute, nous avons montré que l'influx initial de Cd dans les gammares répondait à des variations de biodisponibilité de ce métal. Ceci a été possible car il a été montré au préalable que, dans des conditions favorisant au maximum la biodisponibilité du Cd, les influx de Cd s'accroissent de manière linéaire en fonction de la concentration en Cd dissoute. Cette linéarité permet de développer un modèle simple liant les influx de Cd dans *G. pulex* à la concentration en Cd de l'eau. Ensuite, l'influence de modifications de la biodisponibilité sur les influx de Cd a été vérifiée. Cet influx est diminué :

- en présence de ligands organiques dans l'eau, ce que nous avons interprété comme une conséquence du phénomène de complexation,
- et si l'on augmente la concentration en ions calcium de l'eau, ce que nous avons interprété comme une conséquence d'un phénomène de compétition inhibitrice par cet ion sur le mécanisme d'internalisation du Cd.

En outre, il a été possible d'adapter la modélisation des influx, en fonction de l'exposition par voie dissoute, pour qu'elle tienne compte de ces modifications de la biodisponibité selon les milieux aquatiques. D'une part, la prédiction des influx dans une eau quelconque (avec ou sans ligands organiques, de type substances humiques ou de type chimique) est meilleure si on la fonde sur la concentration inorganique, calculée par un modèle de spéciation, ou sur la concentration en métal labile, mesurée par la technique du gradient de diffusion en couche mince (DGT), que sur la concentration en métal dissous. D'autre part, il peut être

tenu compte de l'influence de la compétition par les ions calcium sur la biodisponibilité en considérant que le taux d'entrée par voie dissoute chez *G. pulex* dépend de la concentration en calcium. A ce sujet, il a été montré, en première approche, qu'une loi simple dérivée du modèle de compétition inhibitrice de Michalelis-Menten-Henri permettait de rendre compte de nos observations.

Il a donc été apporté une réponse à la question « comment peut-on tenir compte de l'influence de la complexation sur la biodisponibilité du Cd en présence de ligands organiques ? » qui fait appel à deux techniques différentes : une mesure, la DGT et la modélisation (de la spéciation des métaux). Nos résultats ne vont pas jusqu'à pouvoir discriminer laquelle des deux méthodes proposées est la meilleure, celle fondée sur une concentration en métal définie sur le plan chimique (inorganique) ou celle utilisant la concentration en métal labile, qui ne correspond pas à la concentration d'une espèce chimique ou d'un groupe d'espèces chimiques. Ainsi nous avons répondu au plan opérationnel, par différence avec une réponse théorique. Par réponse théorique, on entend ici qu'une réponse à la question posée à propos de la biodisponibilité devrait pouvoir être apportée en utilisant les descripteurs existants des processus chimiques de la spéciation du métal en solution et des processus biochimiques à l'interface avec les organismes (diffusion, internalisation par un processus de transport etc.) : chacune des formes de spéciation revêtant un certain degré de biodisponibilité.

Ces expériences de bioaccumulation par voie dissoute ont permis de quantifier les constantes du premier ordre du modèle biodynamique du Cd, c'est-à-dire celles d'une modélisation simple de l'influx, en fonction de la concentration en métal labile, et de l'efflux, en fonction de la teneur en Cd des gammares. Lors d'expériences du même type en milieu minéral, ces paramètres ont également été déterminés pour le benzo[a]pyrène. Contrairement au cas du Cd, cette substance disparaît rapidement des tissus de l'invertébré lors d'une phase de dépuration ce qui est probablement dû à sa dégradation lors de sa métabolisation. Ce processus, en soi, mériterait de plus amples développements afin que l'élimination du benzo[a]pyrène par les gammares puisse être modélisée. Il n'a pas été montré, par exemple, que cet efflux était proportionnel à la teneur bioaccumulée. Nos recherches ultérieures sur la bioaccumulation en lien avec l'exposition se sont donc

concentrées sur le cas des métaux.

Sur la voie trophique de contamination en métaux

La voie trophique de bioaccumulation du Cd et du Cu a été mise en évidence dans un second temps. Ceci a pu être réalisé après adaptation au cas de *G. pulex* d'un protocole de suivi de traceurs métalliques (des isotopes stables des métaux parmi lesquels un traceur non-assimilable) dans la nourriture, les fèces et les tissus des invertébrés aquatiques. Ce protocole est adapté au calibrage de l'efficacité d'assimilation, paramètre du modèle biodynamique régissant l'apport par voie trophique, modulo le taux d'ingestion et la teneur en métal dans la nourriture. Deux méthodes permettent d'interpréter une telle expérience, l'une fondée sur le calcul des ratios de traceurs dans les fèces et la nourriture et l'autre partant d'un bilan de masse. En ^{106}Cd, ces méthodes ne sont pas concordantes et, en lien avec ceci, les bilans de masse ne sont pas équilibrés. Pour autant, nous pouvons estimer que l'efficacité d'assimilation se situe dans la fourchette de 6 à 40% et nous proposons d'utiliser une AE médiane de 23% dans la suite des modélisations utilisant ce paramètre. Dans le cas du ^{65}Cu, aucune de ces deux méthodes n'a permis de quantifier l'efficacité d'assimilation, que nous avons estimées à 6% sur la base des teneurs bioaccumulées en fin d'expérience. La question de l'adaptabilité du protocole de traçage du processus de digestion à *G. pulex* reste donc en partie posée. Des effets de matrice à l'analyse pourraient avoir entraîné les incohérences rencontrées dans le cas du ^{65}Cu.

L'efficacité d'assimilation du Cd de 23%, permet de supposer que l'apport en Cd n'est pas purement trophique ou purement par voie dissoute (ce qui arrive chez certains organismes) et dépend de la contamination relative des feuilles et de l'eau chez *G. pulex* (contrôle par les conditions d'exposition). *G. pulex* étant omnivore, il représente un organisme de choix pour continuer d'étudier la voie trophique de bioaccumulation dans les invertébrés aquatiques. La question de la biodisponibilté des métaux en fonction des caractéristiques de la nourriture n'a pas été traitée, par exemple.

Sur la validation "terrain" des modèles de bioaccumulation afin de lier cette donnée aux conditions physico-chimiques de l'exposition

La démarche adoptée lors des calibrages du modèle biodynamique du Cd chez *G. pulex* mène à considérer que cette bioaccumulation peut désormais, malgré sa complexité réelle, être modélisé grâce à trois variables du milieu aquatique : la concentration en Cd labile dans l'eau, la dureté calcique de l'eau et la teneur en Cd de la nourriture. En passant à l'interprétation d'expériences *in situ*, où les conditions physico-chimiques n'étaient pas contrôlées *a priori*, nous avons cherché à confirmer la validité de cette modélisation. Il a été montré que les influx de Cd dans une population de *G. pulex* transplantée sur des sites où les concentrations en Cd labile étaient élevées (de 0,03 à 1,4 $\mu g.L^{-1}$ contre environ 0,01 $\mu g.L^{-1}$ usuellement) étaient en lien avec ces concentrations labiles et que le modèle biodynamique permettait d'en obtenir une prévision acceptable. Notre modélisation tient compte de la voie trophique en faisant une hypothèse qui tend à la minimiser ("les feuilles consommées par les gammares lors des transplantations ne se contaminent pas en Cd par contact avec le milieu"). Cependant, après avoir constaté des sous-estimations des prévisions à certains sites, nous présumons que la voie trophique mérite d'être contrôlée en mesurant le taux d'ingestion des gammares et la contamination des feuilles. Un modèle de bioaccumulation du Zn chez *G. pulex*, différent du modèle biodynamique, a été étudié aussi, sans que la validation soit probante puisque tous les accroissements des teneurs en Zn notables observés ont été sous-estimés par ce modèle. Il reste néanmoins que la teneur en Zn des gammares s'accroît en fonction des concentrations en Zn labile. Il serait souhaitable qu'une modélisation biodynamique puisse être comparée au modèle testé pour le Zn afin de discuter de l'adaptation de ce modèle à un métal dont il existe une teneur basale.

Enfin, nous avons précisé dans quelle mesure les teneurs en métaux dans les gammares autochtones pouvaient fournir une information de type «surveillance biologique du milieu aquatique», en lien avec la contamination du milieu en métaux. Le suivi des teneurs métalliques dans la population de *G. pulex* d'un site sur une période de huit mois nous a permis de valider un protocole de mesure et de mettre en évidence les biais pouvant survenir lors de la caractérisation de la contamination d'un site par des mesures des métaux dans les gammares. Les teneurs en Cd et Ni, contrairement à celles en Cu et Zn, varient dans

le temps. Les causes de ces variations n'ont pas été identifiées de façon indiscutable : de futures recherches pourraient examiner le rôle possible de conditions biologiques saisonnières, comme le cycle de reproduction, et de conditions limnologiques, comme les crues, sur les variations de ces teneurs. Ignorant pour l'instant les causes de ces variations, des comparaisons précises (en-deçà d'un facteur deux) entre des teneurs métalliques dans les gammares ne peuvent se faire que sur la base d'échantillons prélevés aux mêmes dates (au mois près) et le lien avec la contamination d'un site ne devrait se faire qu'en dehors des périodes de crues. En mesurant ces mêmes métaux (Cd, Ni, Cu et Zn) sur différentes stations à l'échelle du bassin versant, il a été montré que les teneurs en Cd et Ni présentaient davantage de variations entre les sites que les teneurs en Cu et Zn, très regroupées autour d'une teneur moyenne (qui peut être interprétée comme un niveau de métal essentiel). Ces teneurs ne sont pas corrélées à la contamination des sédiments pour ces quatre métaux. Dans le cas des teneurs en Cd et en Ni, cette constatation permet d'affirmer que cette mesure dans les gammares n'est pas redondante avec la mesure chimique (du sédiment) et qu'elle apporte donc une information sur la biodisponibilité des métaux dans les milieux aquatiques. Le phénomène de régulation des métaux essentiels pourrait expliquer leur relative constance dans le cas du Cu et du Zn, s'il était montré que les concentrations en ces métaux (dans l'eau) varient aussi de manière non-corrélée à ces teneurs.

Perspectives

L'interprétation des différentes teneurs en métaux des gammares pourrait être renforcée en suivant quatres perspectives qui ressortent des résultats de cette thèse. Deux perspectives immédiates sont, d'une part de balayer de manière large (et non plus selective) l'influence des facteurs de contrôle de la bioaccumulation par voie dissoute, et d'autre part d'améliorer la précision du protocole de détermination de l'éfficacité d'assimilation des métaux par voie trophique. Deux perspectives de plus grande ampleur sont de déterminer l'influence de la multicontamination métallique, et des phénomènes biologiques d'acclimatation et d'adaptation, sur la bioaccumulation des métaux chez *G. pulex*.

Par balayage large des facteurs de contrôle de la voie dissoute de bioaccumulation du Cd, nous entendons la détermination, lors d'un même plan d'expérience, de l'influence sur la biodisponibilité du Cd du pH, de la concentration en Zn^{2+}, en Mg^{2+}, en Ca^{2+} (liste non-exhaustive de compétiteurs du Cd évoqués dans l'état des connaissances) et de celle des ligands du Cd, comme les ions Cl^{-} et les ligands organiques dissous. Il s'agirait d'améliorer la performance de la méthodologie présentée au paragraphe II.2.1 par une réduction du nombre de traitements en utilisant la technique des plans d'expérience. L'utilisation de cette technique est d'autant plus préconisée qu'un domaine de linéarité de la bioaccumulation, dans le temps et en concentration, a été mis en évidence, ce qui est suceptible de simplifier le plan d'expérience. Cette technique permettrait en outre d'acquérir des informations sur les effets croisés possibles de plusieurs facteurs de contrôle.

Concernant la seconde perspective immédiate (la voie trophique), la détermination des quantités de traceurs dans les feuilles est à améliorer dans le cadre méthodologique présenté au paragraphe III.1.1. Comme pistes d'amélioration, il serait souhaitable à l'avenir de faire des mesures avant et après consommation des feuilles par les gammares durant la phase de contamination (et non seulement après) et d'effectuer les modifications méthodologiques nécessaires à la détermination des teneurs en Cu. Par ailleurs, nous avons vu que le temps de rétention digestive de *G. pulex* justifiait d'ammoindir d'un facteur trois les intervalles de temps entre les prélèvements de fèces (pour ramener la durée totale de l'expérience à environ trois jours). Avec un horizon plus large, l'étude des facteurs de

contrôle de la voie trophique de bioaccumulation du Cd chez les gammares peut faire suite à notre travail.

Enfin, dans le cadre du modèle biodynamique, de nouvelles recherches sont à mener concernant l'étude des effets de la multicontamination (situation possible voire fréquente sur le terrain, cf. cas de l'Amous) et des phénomènes d'acclimatation et d'adaptation. Un des effets possibles de la multicontamination est de modifier la biodisponibilité des métaux par voie dissoute et par voie trophique (cf. I.2.1.2 où est évoqué l'effet possible de la compétition du Zn sur l'entrée du Cd). Ceci renforce la portée de la première des perspectives que nous indiquons. De plus, une hypothèse admise jusqu'à présent et que la multicontamination n'entraîne pas de modifications biologiques jouant sur la biodynamique des métaux (Luoma et Rainbow, 2005), ce qui mérite d'être validé et précisé. A ce sujet, une question qui reste en suspens est : dans quelles limites les paramètres biodynamiques pour un métal sont indépendants de l'apparition des phénomènes de toxicité liés à la présence d'autres microcontaminants ?

ANNEXE 1 : TABLEAUX ANNEXES

ions ou paramètre Eaux ↓	Cl-	NO_3^-	PO_4^{3-}	SO_4^{2-}	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	CO_3^{2-}	pH
					$mg.L^{-1}$					
Minérale FOS	67	27	NA	68	30	2.4	99	5.1	NA	7,2
Grand-Barbier	0,9	0.8	NA	1.1	1.7	0.9	3.5	2.7	26	8,6
Montfras	22,6	NA	NA	9,3	10,6	3,7	96	6,1	298	8,1
Monfras à dureté augmentée	137	NA	NA	9,3	10,6	3,7	225	6,1	298	8,3

Tableau 12 Données physico-chimiques des eaux utilisées lors des toxico-cinétiques du Cd par voie dissoute chez *G. pulex*, y compris les eaux utilisées pour faire varier la concentration en calcium de l'eau lors de l'expérience *calcium.*

Prestataires	Nb échantillons	Intervenants
GREBE (Lyon)	8	Anne Morgillo
Diren Centre	10	Frédéric Pétel & Marie-Laure Giannetti
Diren Haute-Normandie	8	Michel Chovet
Diren Ile-de-France	12	Christian Lalanne-Cassou
Diren Lorraine	5	Jean-Luc Matte & Pierre Mazuer

Tableau 13 Collaborateurs ayant échantillonné les gammares dans le cadre de l'étude de la contamination métallique de *G. pulex* à l'échelle du bassin versant Seine-Normandie. Nous les remercions pour leur collaboration.

ANNEXE 2 : PROTOCOLE D'EXTRACTION SUIVI DE PURIFICATION DES HAP EN MATRICE ORGANIQUE (Y COMPRIS TISSUS D'INVERTEBRES AQUATIQUES) POUR L'ANALYSE TRACE / ULTRA-TRACE EN GC-MS.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

La préparation des échantillons comprend la description des étapes du Tableau 14.

	Conservation	
	Lyophilisation	
	Broyage au mortier	
Etape 1	Prise d'essai et introduction de l'étalon interne (EI)	
Etape 2	Ajout du solvant d'extraction (et de béta-mercaptoéthanol)	20mL et 30µL
Etape 3	Extraction micro-ondes	15 min/30W
Etape 4	Filtration sur coton de verre	Sortir 30' avant Al2O3
Etape 5	Evaporation rapid-vap	réduire à 0.5 mL
Etape 6	Purification sur colonne d'alumine	Cond/5mL/DCM
Etape 7	Evaporation sous flux d'azote	réduire à 0.5 mL
Etape 8	Purification (ou séparation des aliphatiques) sur colonne de silice	Sortir 30' avant la silice
Etape 9	Evaporation sous flux d'azote et conditionnement GC-MS	réduire à 0.2 mL
Etape 10	Introduction du standard « seringue » (EI d'injection)	
	Analyse GC-MS	

Tableau 14 Résumé des étapes clefs du protocole. La conservation des échantillons (organismes exposés au HaP) se fait au congélateur -72°C et la lyophilisation dure 2 j dans le lyophilisateur.

Etape 1. Prise d'essai et introduction de l'étalon interne (EI)

Matériel : Microbalance + spatules. Lancer l'autocalibrage lors d'une première utilisation (ou vérifier la pesée d'étalon balance externes). Bien nettoyer la spatule entre chaque prise d'essai (éthanol & serviette papier). De plus, on utilise la pipette électronique de précision 100 µL et des grands matras en verre pour l'extraction micro-onde.

Solution : Solution d'étalon interne deutéré

Peser le tube sans son étiquette amovible avant et après utilisation (noter dans cahier)

1) Tare du matras
2) Introduction de la prise d'essai de matrice à analyser - *0.025 g par échantillon*
3) Sur la balance, re-tarée, introduire l'étalon interne – *20µL** et noter la pesée

La masse de l'étalon interne introduite doit être dans l'être en quantité similaire au composé à analyser (+/- un ordre de grandeur max)

Double étalonnage : EI 1 en tout début de préparation de l'échantillon i.e. à la prise d'essai et EI2 juste avant injection en GC i.e. sans aucune étape ultérieure, même pas une conservation au congélateur.

Etape 2. Ajout du solvant d'extraction (et de béta-mercaptoéthanol)

4) Ajout de 30 µL de béta-mercaptoéthanol pur (99% ; solution commerciale)
5) Ajout 20 mL de solvant d'extraction

La dispensette gicle et peut poser des problèmes de précision donc ne jamais délivrer les volumes que via un Becher dédié. NE JAMAIS EMPLIR DIRECTMENT LE MATRAS

béta-mercaptoéthanol sent très mauvais → sous hotte !

Le procédé d'extraction par micro-ondes nécessite un solvant polaire ou au moins polarisable afin de convertir les micro-ondes en chaleur. C'est le cas du dichlorométhane.

Etape 3. Extraction micro-ondes

6) Préparer le matériel :

a. Allumer les 2 interrupteurs du système de refroidissement
b. Rincer les colonnes de refroidissement au DCM
c. Allumer l'appareil puis le boitier de contrôle MA :#04 (4 matras) / P1 :15 (puissance à 15% car le maxidigest délivre 200W au total) / T1 :15 (minutes)
d. Appuyer 2 fois sur Start

7) Fin d'utilisation
   a. Rincer les colonnes de refroidissement au DCM
   b. Bien éteindre les 2 interrupteurs du système de refroidissement si personne ne se sert du rotavap qui est également en série sur ce refroidissement.

Etape 4. Filtration sur coton de verre

Séparation du résidu matriciel sur un filtre constitué d'un petit bouchon de laine de verre au fond d'un entonnoir en verre.

Matériel : « Robot » ou cuve-microcolonne & pompe à vide.

8) Sortir l'alumine du four 180°C (cf. → étape 6) la laisser refroidir.
9) Préparation du matériel
   a. Préparer les filtres (entonnoirs & coton pré-nettoyé)
   b. Préparer le robot avec en récupération les tubes adaptés au rapid-vap
   c. !! nommer sur les tubes rapid-vap

TOUJOURS PASSER PAR LA FIOLE DE GARDE DANS LE CIRCUIT D'ASPIRATION . LA SORTIE D'AIR DOIT DONNER SOUS LA HOTTE.

10) Verser LENTEMENT (le DMC gicle) le contenu du matras
11) Rincer les parois du matras 4 fois avec 2 giclées pipette pasteur de DCM

Ne pas toucher les bords des matras, des tubes etc. avec la pipette pasteur sinon en changer.

12) Rincer les parois de l'entonnoir 3 fois avec 1 giclée pipette pasteur de DCM

Etape 5. Evaporation rapid-vap

Matériel : Rapid-vap dont LA SORTIE D'AIR DOIT ETRE SOUS LA HOTTE

Lancer le programme1 après vérification du temps nécessaire (11 minutes OK puis reprendre quelques minutes puis minute par minute). Lancer la pompe à vide seulement quand le rotor commence à atteindre si vitesse finale (le vide démarre automatiquement donc avoir le doigt dessus pour l'éteindre et le relancer).

13) Lancer l'évaporation puis finir progressivement pour ne pas passer à sec. Réduire le volume de solvant à 0.5 - 1 mL est OK pour la purification qui suit (les tubes après purification sont des 24 mL).

Etape 6. Purification sur colonne d'alumine Al2O3

PENSER A SORTIR 30 min AVANT L'AL_2O_3

Matériel : « Robot » ou cuve-microcolonne & pompe à vide

14) Sortir du four 180°C, en prévision de l'étape 8, la silice
15) Préparer la colonne
    a. Bouchon laine de verre.
    b. Installer les flacons poubelle (24 mL)
    c. Conditionner par 2 mL seringue de DCM sans aspirer sous vide tout de suite pour laisser s'imprégner gravitairement les colonnes
    d. Nommer les flacons 24 mL (récupération de la phase hydrophobe DCM)

Ne pas jamais mettre à sec les colonnes, cela les déconditionne.

La chromatographie toujours une sélection préférentielle de composé sur la base de l'interaction tripartite (composé- phase mobile – phase fixe). L'alumine retient les composés polaires, les macromolécules et les pigments.

16) Déposer à la pipette pasteur longue pointe les échantillons (chaque échantillon sa pipette)
17) Rincer avec 3 fois (2mL DCM pipette pasteur) les tubes de rapid-vap
18) Eluer la colonne pour récupérer les composés hydrophobes par 5 + 5 + 5 mL de DCM

Ne pas introduire directement 15 mL, sinon il y a resolubilisation des composés en tête de colonne.

Ne pas dépasser une dépression de 10 mmHg pour ne pas créer de chemin préférentiel dans la colonne (être entre 5 et 10 mmHg)

Etape 7. Evaporation sous flux d'azote

NE PAS OUVRIR LE MANO EN SE PLACANT DEVANT LUI MAIS DE COTE, NE PAS ALLER A SEC.

Matériel : Evaporateur azote. Bouteille d'azote. Attention à maîtriser le support chauffant. Cran 0,5 position haute (80°C) est suffisant. L'éteindre si ça chauffe trop.

Eviter les éclaboussures. Positionner les souffleurs avant d'ouvrir le robinet d'azote.

19) Evaporer les échantillons jusqu'à 0.5- voire 0.2 mL
20) Ajouter environs 0.5 mL d'Isooctane à la pipette pasteur
21) Evaporer à nouveau à 0.5-voire 0.2 mL
22) Ajouter immédiatement 0.5 mL d'Isooctane à la pipette pasteur pour calmer et palier à la continuation de l'évaporation (les tubes sont chaud)

On remplace le DCM (solvant polaire) par de l'Isooctane (solvant apolaire) car la chromatographie sur colonne Silice se fait par gradient croissant de polarité. On ne peut pas remplacer directement par du pentane à cause de l'ordre des points de fusion (P_{fus}).

$P_{fus\ (DCM)} > P_{fus\ (pentane)}$ → Le pentane s'évaporerait avant. $P_{fus\ (DCM)} < P_{fus\ (isooctane)}$ → Le DCM s'évapore bien avant lui.

Etape 8. Purification (ou séparation des aliphatiques) sur colonne de silice

PENSER A SORTIR 30 min AVANT la Silice

Matériel : « Robot » ou cuve-microcolonne 🕮 & pompe à vide 🕮.

23) Préparer la colonne
    a. bouchon laine de verre.
    b. Installer des flacons 24mL de récup. des alcanes (ou bien poubelle)
    c. Conditionner par 5 mL seringue de Pentane sans aspirer sous vide tout de suite pour laisser s'imprégner gravitairement les colonnes

En laissant les tubes poubelle dans le robot :

24) Déposer les échantillons à la pipette pasteur, une par échantillon.
25) Rincer les anciens tubes échantillons avec de PETITES QUANTITES DE PENTANE (3 fois 0.2 mL pipette pasteur)
26) Elution des aliphatiques par 2mL de Pentane.

Ne pas déposer plus de Pentane on risque de "décrocher" les aromatiques.

27) Nommer et placer les tubes de récupération des échantillons.
28) Elution des aromatiques par 5 + 5 + 5 mL de mélange Pentane-DCM 65:35 (prendre effectivement 65mL et 35mL)

L'élution entraîne le décrochage des composés aromatiques, grâce au mélange légèrement polaire avec la silice en absorbant. En tête de colonne resteront les composés les plus polaires.

Etape 9. Evaporation sous flux d’azote et conditionnement GC-MS

NE PAS ALLER A SEC. ATTENTION LE PENTANE EST TRES VOLATIL ET LES TUBES ONT DE L’INERTIE THERMIQUE. ON PASSE DE 0.2 mL A SEC en 20 SEC.

Matériel : Evaporateur azote. Bouteille d’azote. Attention à maîtriser le support chauffant. Cran 0.5 position haute (80°C) est suffisant normalement. L’éteindre si ça chauffe trop.

29) Préparer les flacons GC-MS : septum (partie teflonnée, brillante ou rouge en contact avec les solvants et les échantillons) ; bouchons ; flacons et réstricteurs de volume.
30) Evaporer les échantillons jusqu'à 0.2 mL.
31) Les transférer avec des pipettes pasteur dans les restricteurs GC-MS (0.5 mL)
32) Faire un premier rinçage des fonds des tubes avec 0.1 – 0.2 mL DCM
33) Evaporer à nouveau à 0.5-voire 0.2 mL pour laisser la place à un second rinçage
34) Faire un second rinçage des fonds des tubes avec 0.1 – 0.2 mL DCM
35) Evaporer à nouveau à 0.5-voire 0.2 mL pour gagner en sensibilité (re-concentration)

Seule la partie conique du fond du restricteur doit contenir du solvant. Sachant qu’il reste aussi à rajouter un µ-volume pour le standard seringue (EI d’injection)

Etape 10. Introduction du standard « seringue » (EI d’injection)

UN EI FINAL NE DOIT PLUS RIEN SUBIR AVANT INJECTION

Matériel : Microbalance & pipette électronique de précision 100 µL + cônes

Matériel : Solution seringue. Noter pesée avant / après.

36) Sur la balance, tarée, introduire *20µL** de solution seringue et noter la pesée
37) !! Vortexer les tubes GC-MS fermés pour homogénéiser les échantillons

La masse de standard d’injection à introduire doit être dans l’être en quantité similaire au composé à analyser (+/- un ordre de grandeur max)

ANALYSE QUANTITATIVE DES ECHANTILLONS EN GC-MS

Etape 1 : Préparer la séquence d’analyse selon la structure suivante

Position 1 : toujours un blanc de rinçage Isooctane / Position 2 et 3 : les standards de calibration puis validation des coefficients de réponse en GC-MS / Position 4 : toujours un blanc de rinçage Isooctane / Positions suivantes : les échantillons en commençant par le blanc de manipulation et en allant vers les plus chargés / Fin

de séquence : les standards de calibrage puis validation des coefficients de réponse en GC-MS , et toujours un blanc de rinçage Isooctane pour finir.

Etape 2 : Placer les échantillons dans leurs puits dédiés et lancer la méthode

Etape 3 : Dépouillement des spectres GC-MS

Toujours imprimer le chromatogramme principal (penser à intégrer les pics principaux avant) de tous les échantillons et blancs ; ils reflètent la composition des échantillons, ils peuvent fournir beaucoup d'informations en cas de problème et justifient la qualité des blancs. Sélectionner les ions à extraire, suivant le masse atomique, et imprimer l'analyse chromatographique (penser à intégrer les pics principaux avant) après spectrométrie de masse de ces ions.

PROTOCOLES DE LAVAGE

Vaisselle générale : normalement nettoyée au solvant lors du protocole (tube, bécher et entonnoir), on la rince 5-10 fois à l'eau pour éliminer les traces de solvants puis on la rentre en logistique vaiselle. Elle sera lavée au lave-vaisselle puis pyrolysée. Penser à la ranger en obturant les orifices à l'aluminium.

Mortier (entre chaque échantillon) ; spatules ; pincettes : nettoyer pilon, mortier et spatule à l'éthanol .

Nettoyage du stock de coton de verre : 3 fois 15 min aux ultrasons dans un bécher de DCM.

Nettoyage du stock d'alumine : trempée intégralement dans le DCM.

Vaisselle GC-MS : baigne eau-chaude et RBS les bouchons et les flacons, et on rince les flacons dans la fontaine à flacons pour que l'eau passe partout. Ensuite, pyrolyse (sauf pour bouchon → étuve). Pointes métalliques évaporation flux d'azote : les rassembler dans un becher ¼ rempli de DCM et passer 5 min aux ultrasons, les ranger dans leur étui en aluminium.

ANNEXE 3 : PREMIER ARTICLE

A Model Predicting Waterborne Cadmium Bioaccumulation in *Gammarus pulex*: The Effects of Dissolved Organic Ligands, Calcium and Temperature

Bastien Pellet †‡, Olivier Geffard §, Céline Lacour ||, Thomas Kermoal †, Catherine Gourlay-Francé †, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin †*

† Cemagref, Unité de Recherche Hydrosystèmes et Bioprocédés, Parc de Tourvoie BP 44 92163 Antony, France.

‡ AgroParisTech ENGREF, 19 avenue du Maine, F 75732 Paris

§ Cemagref, Laboratoire d'Ecotoxicologie, 3 bis quai Chauveau 69336 Lyon, France

|| CEREVE, 6-8 Av. Blaise Pascal, Cite Descartes, 77455 Champs sur Marne, France

(*Received* 28 *January* 2008; *Accepted* 28 *June* 2009; Published Online: July 16, 2009)

Figure captions

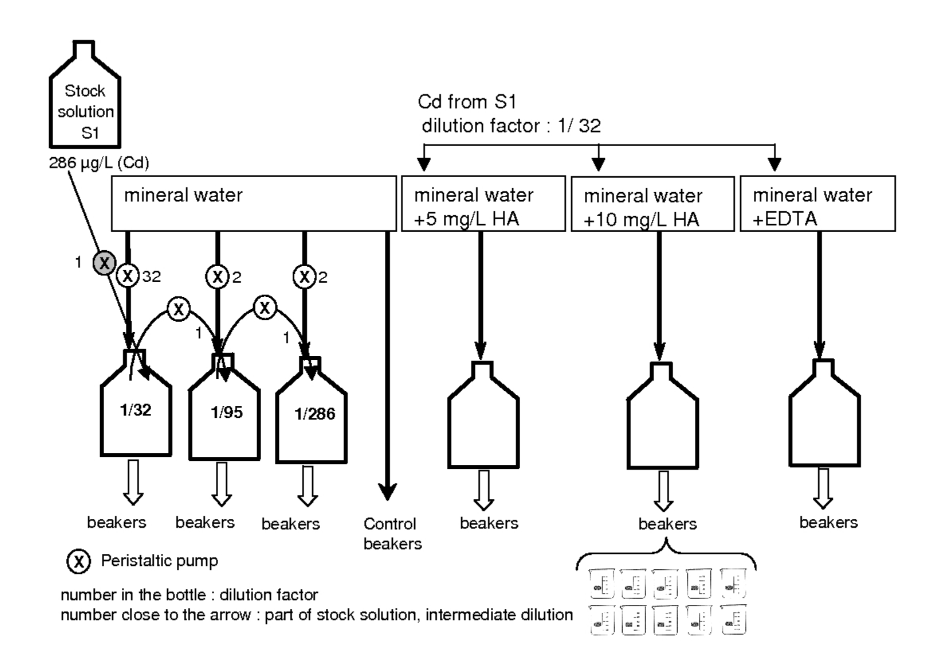


Figure 1. Scheme of the experimental set-up. Flow-through system used to expose gammarids to water containing a range of Cd concentrations, with or without organic ligands. EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; HA = humic acid

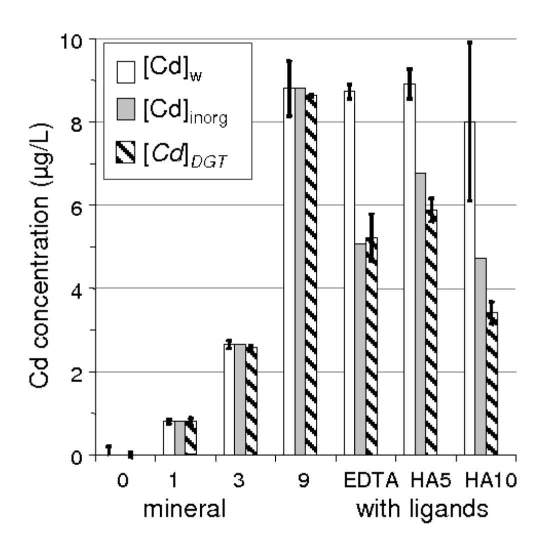


Figure 2. Comparison between $[Cd]_w$, $[Cd]_{inorg}$ and $[Cd]_{DGT}$ for the mineral water treatments and those with ligands : ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or humic acid (HA, nominal 5 and 10 mg L^{-1} HA), mean ± SD during the 7-day accumulation period.

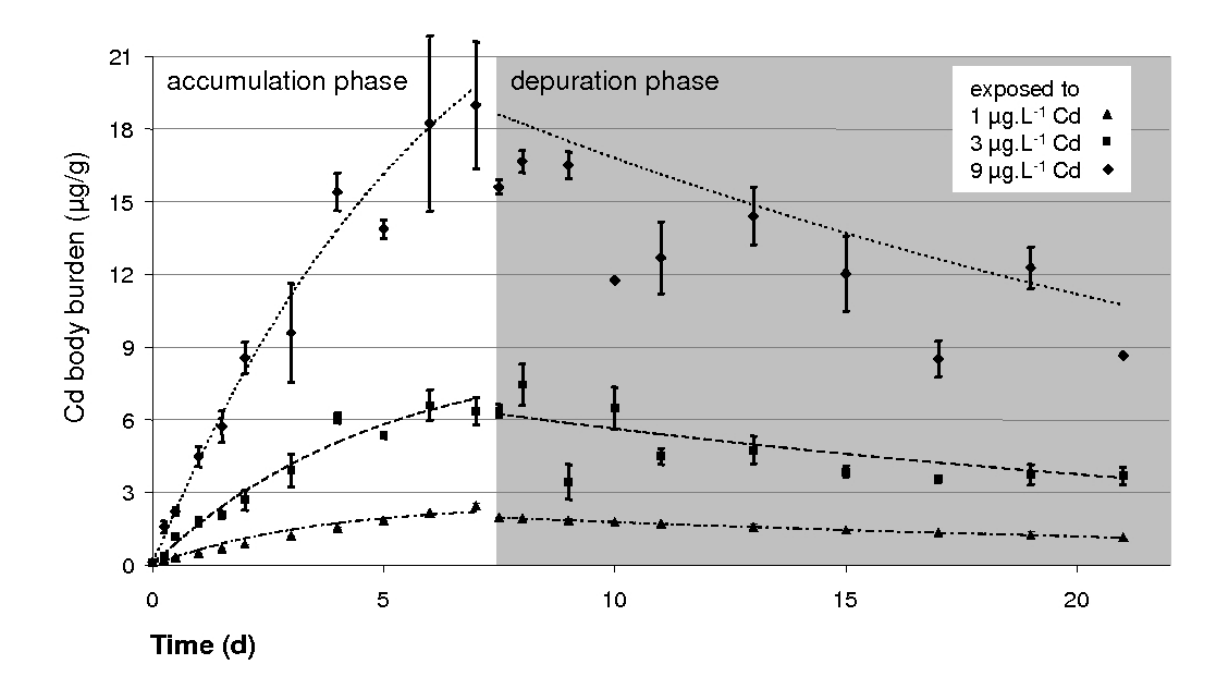


Figure 3. Cd body burden kinetics during accumulations at three Cd exposures in mineral water and during depurations (in gray), mean value ± SD, *n*=3. Curves represent best fit of the data to non-linear regression during the accumulation phase; see Equation 7 in *Materials and Methods*, and exponential decays started at $C_{a(t=7\text{days})}$ during the depuration phase (dashed curves).

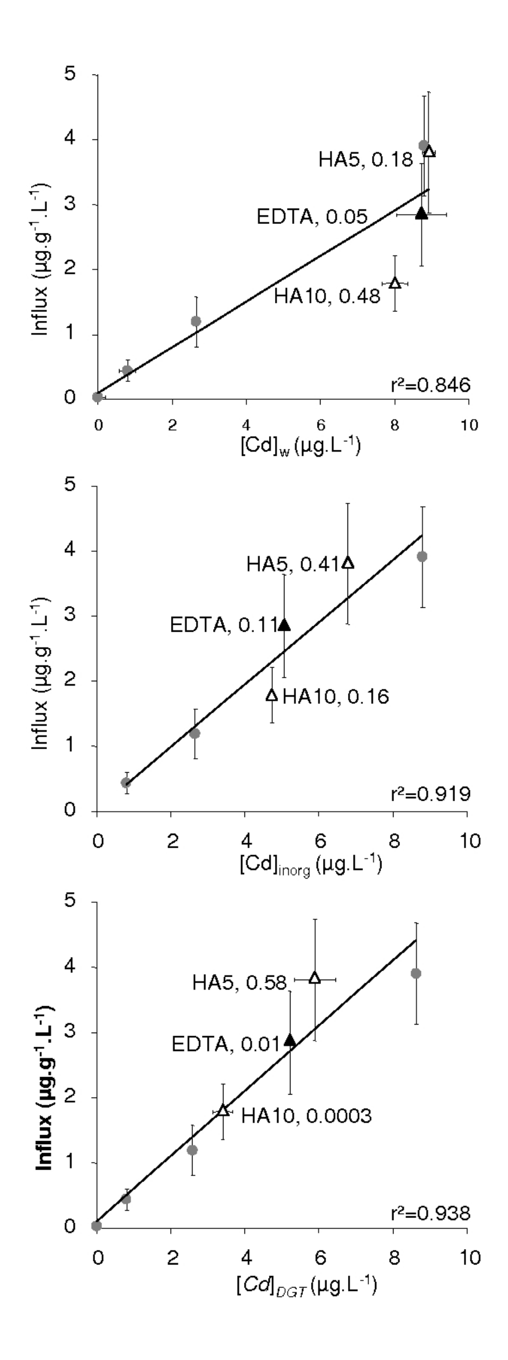


Figure 4. Variation in influxes of Cd in *Gammarus pulex* in µg g^{-1} d^{-1} as a function of $[Cd]_w$, $[Cd]_{inorg}$ and $[Cd]_{DGT}$, in mineral media (●), and experiments with organic ligands : ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, ▲) and humic acid (HA, Δ). The three treatments with organic ligands are labeled with their Cook's distance to the fitted value. Vertical error bars represent 95%-confidence intervals on Cd initial influxes in gammarids and $[Cd]_w$ and $[Cd]_{DGT}$ are given ± standard deviation (horizontal error bars). DGT is the diffusive gradient in thin-films technique.

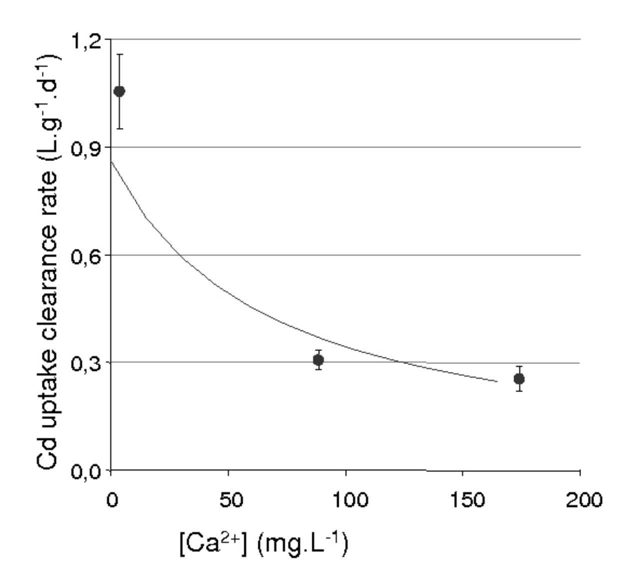


Figure 5. Inhibition of the Cd uptake clearance rate by increasing Ca^{2+} concentrations. The curve is the plot of Equation 8 (model) with K_i = 66 mg L^{-1}.

ANNEXE 4 : SECOND ARTICLE

Running head: dietborne uptake of Cd and Cu in *G. pulex* shredding leaves

Title: Dietborne cadmium and copper uptake in *Gammarus pulex* quantified by a stable isotope technique

Bastien Pellet †‡*, Sophie Ayrault §, Catherine Gourlay-Francé †, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin †

† Cemagref, Unité de Recherche Hydrosystèmes et Bioprocédés, Parc de Tourvoie BP 44 92163 Antony, France.

‡ AgroParisTech ENGREF, 19 avenue du Maine, F 75732 Paris

§ CEA/CNRS/UVSQ-IPSL, Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement, Bat. 12 Av. de la Terrasse, Gif-sur-Yvette 91198, France.

Article en préparation au 31/01/2010

Abstract

Metals associated with leaves can be taken up by aquatic shredders through their diet and hence contribute to metal bioaccumulation. We developed an innovative methodology using stable isotopes to determine the food ingestion rate (IR), gut retention time (GRT), and the metal assimilation efficiency (AE) for a freshwater amphipod shredding on alder leaf-discs. *Gammarus pulex* fed on ^{65}Cu-, ^{106}Cd-, and ^{53}Cr-labeled leaves for 7.5 h and then on unlabeled leaves for 1 week. Metal stable isotope contents in gammarids, leaves, and fecal matter were regularly collected and filtered and were then analyzed by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) equipped with collision cell technology (CCT). Using the CCT improved the methodology by allowing quantitative determinations of the Cr isotopes. As expected, gammarids did not accumulate Cr, which served as inert digestion tracer. The first tracer defecation occurred before the first feces harvest, indicating that the gut passage time was less than 9 h. A 24-h GRT and a 0.69-g/(g d) IR were found. A Cd AE of about 23%, within the 6–40% range, was estimated using two calculation methods. Since the Cu mass balance was systematically biased, most probably because of a matrix effect on the ICP-MS analysis of the Cu content in leaves, Cu AE was estimated on the basis of the amounts of ^{65}Cu retained by gammarids and a previously determined Cu elimination rate. A 6% Cu AE was estimated. In the framework of the dynamic multi-pathway bioaccumulation model (DYM-BAM), these AEs tend to show that the dietborne uptake of Cd, contrary to Cu, contributes to the metal bioaccumulation in *G. pulex* shredding alder leaves.

Keywords: Bioaccumulation, *Gammarus pulex*, Cadmium, Copper, DYM-BAM

INTRODUCTION

Freshwater species exchange metals (Cu, Zn, Ni, Cd, etc.) with their surrounding aquatic environment, and it remains a great challenge to link the bioaccumulation with the sources of contamination, namely, water, sediments, and food. The in situ contributions of dietborne and waterborne metals to the total bioaccumulation can be estimated by using bioaccumulation models [1]. A model that unifies the current understanding of both toxicokinetics and metal physiology, the dynamic multi-pathway bioaccumulation model (DYM-BAM), has been validated on field data of the metal body burden in aquatic (freshwater and marine) invertebrates [2]. Briefly, according to the DYM-BAM, the dietborne influx of a metal is driven by the food ingestion rate (IR), the bioavailable metal concentration in food, and the assimilation efficiency (AE). Assimilated metal is defined as the amount of metal ingested via contaminated food that penetrates across the cells of the gut wall and hence can be incorporated into the tissues [3]. AEs are commonly used to compare absorbable metal fractions among various situations characterized by a type of food, eaten by a given species, under specific digestion dynamics, etc. It has been shown, for example, that cadmium (Cd) is assimilated more efficiently by the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus* when feeding on sediments than on phytoplankton [4].

The pulse-chase feeding method (a quick pulse of metal-contaminated food ingestion followed by a depuration phase) is commonly used to determined AEs in the framework of the DYM-BAM [5,6], and new methodologies have recently been proposed to investigate digestive metal physiology using stable isotopes [7,8]. The use of tracers (radiotracers or stable isotopes) allows discrimination of the added amounts of metals from the background. When the passage of the contaminated food is over, organisms are sacrificed and a mass balance of the target contaminants can be settled on the system (composed of the food(s), the organisms, and their feces). Alternatively, AEs can be calculated on relevant ratios of tracers in the food and the feces, providing that the food is dually labeled with an unassimilated (or inert) tracer [3]. In most cases, gamma-emitting radiotracer methods were used to determine AEs. With this technique, Roditi and Fisher [9] found a Cd AE in the 19–72% range for *Dreissena polymorpha* feeding on eight food types. However, a stable isotope

method was needed for the reasons advocated by Croteau and Luoma [7]: handling and disposal hazards are reduced, costs are minimal, and, moreover, the method also increases the possibilities of studying dietborne influxes of metals. For copper (Cu) especially, AE could not be measured using radiotracers since the ^{64}Cu half-life (12.7 h) is too short to work with given that digestion processes can last several days. Using the stable isotope tracer ^{65}Cu and a dual label tracer technique, Croteau and Luoma [7] found a 38% Cu AE for *Corbicula fluminea,* and Smokorowski et al. [10] found a 21% Cu AE for the mysidacea *Mysis relicta* preying on labeled daphnids. Although the stable isotope method has recently been improved with the use of ^{53}chromium (Cr) as an inert tracer [8], the quantitative analysis of the various Cr isotopes remained problematic with ICP-MS. One the one hand, ICP-MS has low detection limits and allows isotope-specific measurements in metal dynamic studies. On the other hand, the determination of low-content transition metals in biological material suffers from numerous polyatomic interferences [11] (e.g., the formation of $(^{40}Ar^{12}C)^{2+}$ ions that overlap with the $^{52}Cr^{2+}$ peak). Hence, using a CCT before the ICP-MS quadrupole system was proposed by Nixon [12] for interference-free measurements of Cr isotopes and overcame the analytical difficulties encountered by Croteau et al. [8].

Gammarids are increasingly used to monitor metal contamination of freshwater environments. Fialkowski et al. [13] have proved the feasibility of using *Gammarus fossarum* as a metal biomonitor in a river impacted by Pb-Zn mining activities, and Cu sequestration capacities in *G. locusta* have been described by Correia et al. [14]. Since *G. pulex* is ubiquitous in European freshwaters and a key species in the food web of streams [15], numerous studies provide useful information on its feeding behavior [16-18]. Moreover, it is one of the rare crustaceans for which the influence of natural and anthropogenic stressors on the ingestion rate has been investigated [19], which strengthens the potential accuracy of forecasts of the dietborne uptake of trace metals in situ. Knowledge of the Cd AE in *G. pulex* would provide missing parameters in the DYM-BAM, as waterborne uptake parameters have been previously determined [20]. Therefore, the present study aimed at determining the assimilation efficiencies of Cd and Cu in *G. pulex* and at testing the potential improvements resulting from using the CCT.

MATERIALS AND METHODS

Study organisms and materials

Approximately 100 *G. pulex* were collected in the Mauldre River at Mareil-sur-Mauldre (RGF93 coordinates, longitude: 01°52'11'' E, latitude: 48°53'42'' N) on 19 February 2008. The mean size of selected gammarids was 11.5 ± 2 mm. Animals were kept in a temperature-controlled incubator (12.1 ±0.8 °C) under an 8:16 light:dark cycle (acclimatization and experiment). Gammarids were given alder leaves (*Alnus glutinosa*) ad libitum for 3 d and starved for the consecutive 3 d prior to the experiment. Filtered water (sieve of 200 µm mesh size) from the sampling site was used as the first input in the acclimatization aquaria. This water was progressively replaced with commercial groundwater (Source St Hélène, SE DES SOURCES ROXANE, La Ferrière Bochard, France) over 6 d. During the experiment, the physical and chemical characteristics of the water were measured (see **Table S1, supplemental information**).

Digestion procedures were performed using HNO_3 (65% suprapur, Merck, Darmstadt, Germany) and H_2O_2 (30% (w/w) in H_2O, Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France). NaOH (Acros Organics, SLR extrapure pellets) was used in the leaf-labeling procedure. A 1-M NaOH solution was prepared using NaOH pellets and deionized water. We purchased 10-mg oxides of ^{53}Cr (as Cr_2O_3, 97.7% isotopic purity), ^{65}Cu (Cu_2O, 99.6%), and ^{106}Cd (CdO, 89.8%) from Eurisotop (St. Aubin, France). The metallic oxides were first solubilized (partially) for at least 7 d in nitric acid (except for Cr_2O_3 for which a stronger acidic solubilization procedure was applied using hydrofluoric acid and heat) and then 1.5 ml of the supernatant was diluted in 10 ml ultrapure water, providing three stock solutions of 100 mg L^{-1} of ^{65}Cu, ^{106}Cd, and ^{53}Cr. A 1,000-µg L^{-1} Ge solution in HNO_3 0.5 N was prepared by diluting a 1,000-mg L^{-1} Ge standard solution (PlasmaCal, SCP Science, Courtaboeuf, France).

Leaf-disc labeling

Alder leaves (*Alnus glutinosa*) were collected in November 2007 after abscission and before leaf fall and stored in plastic boxes. Before the experiment, they were placed in an aquarium filled with several liters of stream water for 20 d at 12°C. The water was renewed

once (after 2 d) to remove the first exudates from the leaves. Twenty leaf-discs were produced using a punch (diameter, 2 cm). The discs were exposed for 3 d to mineral water spiked with ^{53}Cr (413 µg L^{-1}), ^{65}Cu (390 µg L^{-1}), and ^{106}Cd (793 µg L^{-1}). This solution was obtained by diluting 200 µl of the ^{53}Cr stock solution, 200 µl of the ^{65}Cu stock solution, and 400 µl of the ^{106}Cd stock solution in 50 ml ultrapure water. As this medium would be too acidic to allow leaf conservation, drops of 1 M sodium hydroxide were added to raise the pH to 7.5 one minute after introduction of the discs. The rapid rise in pH favors the binding of metallic cations on the ligands on the leaf surface, and hence metal adsorption onto the disc surfaces. After exposure, discs were rinsed over 4 d in a 20-L stirred aquarium with ultrapure (Elga) water to remove weakly adsorbed metals.

Pulse-chase feeding method

We conducted a pulse-chase feeding experiment adapted from others [5,21]. Gammarids were given stable isotope-enriched leaf-discs during a hot-feeding phase (HFP) of 7 h and 24 min, and then were given unlabeled leaf-discs during a 7-d depuration phase. The HFP had to be shorter than the gut time passage (time to defecate the first tracers after the pulse) in order to avoid any tracer recycling. Based on previous studies [10,22], the *G. pulex* gut retention time (GRT), i.e., the time to defecation of 90% of the organic matter ingested during the pulse, was assumed to be 3 d. Hence, the gut time passage was expected to be 16 h, applying a 4.5 ratio between the gut time passage and the GRT, according to Croteau et al. [8] determination on the gasteropod *L. stagnalis.* The defecation phase duration was chosen in order to ensure the complete recovery of the tracers. Moreover, Cr was assumed to be an inert tracer of gammarid digestion, i.e., not assimilated at all. This was verified a posteriori (cf. Supplemental **Table S2, supplemental information**).

Ten feeding chambers allowing the collection of amphipod feces were designed based on Werner's model [23] (see **Figure S1, supplemental information)**. The metal content of the fecal production of an individual *G. pulex* within a few hours was not measurable, the limiting step being the operational precision of the weighting procedure of approximately 10 µg. Therefore we chose to work with a group of seven *G. pulex*. The amphipods were placed in the upper chamber of 125 mm^3 made of 5-mm mesh cubic bags (immerged) and feces were collected on the bottom of the 600-ml plastic beakers. In two

control treatments, C1 and C2 (the eight other treatments being numbered from 1 to 8), unlabeled leaf-discs were given during the HFP. Both the labeled and unlabeled leaf-discs were eaten at the same rate (~ one disc per day by seven gammarids, based on naked eye observation of food residues). Because it prevented cannibalization, a type of toy consisting of a 5-mm mesh square (6 cm²) stuck into a 5-L bottle cap was also immerged in each beaker. In one beaker (# 6), one gammarid was eaten by its congeners during the HFP. No other mortality was observed during the whole experiment. Exuviated molts were reingested by gammarids (no exuviates were observed during the HFP). Approximately five juveniles, newly born during the experiment, were removed from the beakers when discovered. Feces were harvested at *t*= 12, 24, 36, 48, 72, 96, and 166 h as follows: they were first concentrated in a clean 5-cm-diameter plastic Petri dish using a polyethylene 10-ml pipette and this concentrate was transferred to the top of a filtering system (PTFE filter unit on vacuum system) and filtered through a polytetrafluoroethylene membrane filter (Whatman, 25 mm; 0.45 µm pore size). At the end of the experiment, gammarids were sacrificed for metal analysis. Filtered water samples (Whatman PTFE, 10-ml syringe filters, 0.5 µm) were taken in each replicate at the beginning of the HFP and then before each feces collection. They were immediately acidified by adding 200 µl of ultrapure nitric acid.

Sample preparation

The feces on filters, the reference material ERM-CE 278 mussel tissue (IRMM, Brussels, Belgium), and the pools of gammarids were dried for 48 h at 45°C and handled in individual covered Petri dishes to prevent atmospheric deposition of trace metals. Fecal matter was weighed on the PTFE filter on a microbalance (Sartorius SE 2-F for filter weighting, 0.1 µg). The feces were not digested with the filter because methodological blanks showed high concentrations of ^{53}Cr in these samples, which caused a net tracer signal of ^{53}Cr. Ultra-clean or disposable material was used throughout. Vessels, beakers, and the PTFE filtering system were acid washed (10% HNO_3 bath for 48 h) and rinsed (Ultrapure water) before use. Mussel tissue (ERM-CE278, 40 and 132 mg) and gammarids (pool of seven gammarids of approximately 40 mg), leaves (≈ 10 mg), and feces (pooled feces of the experimental group of gammarids ≈ 4 mg) were digested with nitric acid (50 µl per mg) for 24 h, after which 20 µl mg^{-1} of hydrogen peroxide was added, in closed SCP-Science

polyethylene tubes for DigiPrep. Subsequently, the solution was heated at 95°C for approximately 4 h in DigiPrep Block (SCP Science) under a laminar flow hood and hence evaporated to near dryness. Samples were removed from the heating block immediately when dryness was reached (maximum, 100 µl residue) and filled up to 5 ml with HNO_3 0.5 N solution. Lastly, 5 µl of 1,000 µg L^{-1} Ge solution was added to the samples as an internal standard (see below). All volumes were monitored by weighing the tubes at relevant steps of the sample preparation.

ICP-(CCT)-MS analysis

Cr isotopes (of atomic mass 50, 52, 53, 54), Cu (63, 65), Cd (106, 108, 110, 111, 112, 113, 114, 116), and germanium (72, 74) were analyzed using ICP-MS equipped with a CCT (CCT-X Series, ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France). The samples were analyzed both in standard mode and in CCT mode with no mathematical corrections for interferences and Ge was used as an internal standard.

Quality controls of the ICP-MS calibration consisted in analyzing a tenfold diluted SRM 1640 river water sample (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Quality controls of the whole method, including the digestion steps, were performed on ERM-CE 278 mussel tissue. Duplicates of both reference materials were analyzed. The limits of detection (LOD), defined as the mean of ten blank signals plus three times the standard deviation (SD) of the blank, were (CCT mode): 0.001 µg L^{-1} for ^{53}Cr, 0.0025 µg L^{-1} for ^{65}Cu, and 0.0002 µg L^{-1} for ^{106}Cd.

Mathematical methods and mass balance equation

A mathematical treatment of the ICP-MS results is necessary to discriminate the net amounts of isotopes from the naturally occurring metallic content in the various matrices analyzed. Tracer concentrations in all samples were determined using the equations adapted from Croteau et al. [21] and described hereafter. Using Cd isotopes in the notations, we exemplified the equations. The same procedure was applied for Cu and Cr isotopes when necessary. First, the p^m ratio was determined for each tracer of atomic mass m (m=53, 65 and 106). p^m is the relative ICP-MS signal intensity over the cumulative total intensities of all

analyzed isotopes for the same element in calibration standards. This quantity is assumed to be constant in all non-spiked natural matrices. For example, for Cd, p^{106} was defined as:

Equation 1

$$p^{106} = mean\left(\frac{I\left({}^{106}Cd\right)}{I\left({}^{106}Cd\right)+I\left({}^{108}Cd\right)+I\left({}^{110}Cd\right)+I\left({}^{111}Cd\right)+I\left({}^{112}Cd\right)+I\left({}^{113}Cd\right)+I\left({}^{114}Cd\right)+I\left({}^{116}Cd\right)}\right)_{STANDARDS}$$

where $I({}^{106}Cd)$ is the ICP-MS signal intensity (counts) of ^{106}Cd in the calibration standards. The isotopes of atomic masses 50, 52, 53, and 54 were used for Cr and 63 and 65 for Cu. We found values of p^{106} = 0.011, p^{53} = 0.083, and p^{65} = 0.33. Second, the total tracer concentration ($[^{106}Cd]_{ê}$) and the original tracer concentration ($[^{106}Cd]^0_{ê}$) were calculated in samples in order to determine the net tracer concentration. The total tracer concentration was calculated as (Equation 2):

Equation 2

$$\left[{}^{106}Cd\right]_{\hat{e}} = p^{106}.\left[T\,{}^{106}Cd\right]$$

where $[T\,^{106}Cd]$ is the elemental Cd concentration inferred by the ICP-MS software from the ^{106}Cd signal intensity, in µg L^{-1}. The original tracer concentration is the fraction of the concentration of the tracer expected, in absence of a spike, given its relative abundance p^n. It was determined according to (Equation 3):

Equation 3

$$\left[{}^{106}Cd\right]^0_{\hat{e}} = p^{106}.\left[T\,{}^{114}Cd\right]$$

The isotopes 52 and 63 were used to determine the original tracer concentration of Cr and Cu, respectively. Lastly, the net tracer concentration ($\Delta[^{106}Cd]_{ê}$) was assessed by subtracting the contribution of the original tracer concentration from the total tracer concentration of the sample (Equation 4):

Equation 4

$$\Delta[{}^{106}Cd]_{\hat{e}} = [{}^{106}Cd]_{\hat{e}} - [{}^{106}Cd]^0_{\hat{e}}$$

where all quantities are expressed in µg L^{-1} (in the sample). Substituting Equation 2 and Equation 3 into Equation 4 leads to Equation 5:

Equation 5

$$\Delta[^{106}Cd]_{\hat{e}} = p^{106}.\left([T^{106}Cd]-[T^{114}Cd]\right)$$

The net tracer amounts in the samples, in ng, were derived by multiplying the net tracer concentrations of the samples (in ng L^{-1}) by the sample volume (in L). They are noted as $\Delta Q^{i}E_{sample}$, where ^{i}E is a tracer and where *sample* is replaced by LL for the labeled leaf-disc samples, by "org" for the mineralized gammarid samples, and by "feces" for feces samples.

The pulse-chase feeding experiment was further interpreted in order to measure AEs. The scheme in **Fig. 1** illustrates the global methodology allowing the mass balance to be checked using net tracer amounts, leading to an AE calculation method. In order to calculate the net amounts of ingested tracers, the mass of leaf-discs ingested by a pool of gammarids during the HFP must be determined for each replicate (m_{leaves} in mg). It was calculated as the cumulative net amount of ^{53}Cr defecated during the depuration, $\Sigma\ \Delta Q^{53}Cr_{feces}$, (ng) divided by the ^{53}Cr concentration (ng mg^{-1}) in the remaining parts of the leaf-disc sampled at the end of the HFP. The ^{106}Cd and ^{65}Cu ingested, hereafter referred to as $\Delta Q^{106}Cd_{LL}$ and $\Delta Q^{65}Cu_{LL}$ (in ng), were calculated by multiplying m_{leaves} by the net tracer concentrations of ^{106}Cd and ^{65}Cu in the leaves (in µg g^{-1}). The mean ingestion rate during the HFP (g g^{-1} d^{-1}) was calculated as the m_{leaves} divided by the dry mass of gammarids (m_{org} in mg) at the end of the experiment and the duration of the HFP (Δt =7.5 h):

Equation 6

$$IR = \frac{\sum \Delta Q^{53}Cr_{feces}}{m_{org}.\Delta t.\Delta Q^{53}Cr_{LL}}$$

Assimilation efficiencies were calculated using two methods: the ratio method and the mass balance method [3]. In both cases, when a tracer ^{i}E is taken up only via dietborne uptake, AE can be calculated as:

Equation 7

$$AE = .\frac{\frac{\Delta[^{i}E]_{org}}{\Delta t}}{IR * \Delta[^{i}E]_{LL}}$$

where $\Delta Q^{i}[E]_{org}$ is the net ^{i}E body burden internalized by organisms (ng g^{-1}). In the ratio method, $\Delta Q^{i}E_{org}$ was assumed equal to the difference between $\Delta Q^{i}E_{LL}$ and $\Sigma\Delta Q^{i}E_{feces}$ and Equation 7 can be simplified using Equation 6, so that the AE can be calculated as:

Equation 8

$$AE = 1 - \frac{(^{106}Cd/^{53}Cr)_{feces}}{(^{106}Cd/^{53}Cr)_{leaves}}$$

where $(^{106}Cd/^{53}Cr)_{feces}$ is the ratio of ^{106}Cd and ^{53}Cr signal intensities in feces after depuration and $(^{106}Cd/^{53}Cr)_{leaves}$ is the ratio of ^{106}Cd and ^{53}Cr signal intensities in the spiked leaf-discs (for additional methodological considerations on the ratio method, see [3,8]). Only the first sample of feces was taken into account in this study because in feces sampled after the first time step, the ^{53}Cr signal intensities were twofold lower than for the control feces. The same calculation was applied for ^{65}Cu. It is valid to apply the ratio method to part of the feces defecated, as long as all the tracers at stake are released simultaneously [3]. This was confirmed a posteriori by the tracer defecation profiles.

With the mass balance method, AEs were calculated using the net amounts of ingested ($\Delta Q^{i}E_{LL}$), defecated ($\Sigma\ \Delta Q^{i}E_{feces}$), and internalized ($\Delta Q^{i}E_{org}$) tracers. AE can be calculated using Equation 6 as formulated above, or else replacing $\Delta Q^{i}E_{org}$ by the difference between $\Delta Q^{i}E_{LL}$ and $\Sigma\Delta Q^{i}E_{feces}$. Both calculations were performed. ^{106}Cd and ^{65}Cu mass balances were checked using the input ($\Delta Q^{106}Cd_{LL}$) over output ($\Sigma\ \Delta Q^{106}Cd_{feces}$ added to $\Delta Q^{106}Cd_{org}$) ratios with the Mann-Whitney U-test and a comparative set of eight times 100%.

Field application and DYM-BAM modeling

The Cd uptake rate from dissolved sources and the elimination rate were previously determined [20]. Based on these parameters and the AE estimated in this study, the DYM-BAM was applied and compared with field data. Nevertheless, to our knowledge, the Cu uptake rate and elimination rates have not been determined for this species yet, so we generated a forecast of Cu accumulation resulting from dietborne uptake using the elimination rate determined by Clason and Zauke [24] for euryhaline gammarids.

Leaves, gammarids, and water samples were taken in April 2008 in an upper affluent

of the La Mauldre River at Vicq (RGF93 coordinates, longitude: 01°49'57'' E, latitude: 48°48'49'' N) in order to compare the forecast of the DYM-BAM with observations in situ for Cd and Cu bioaccumulation. Three types of leaves located in amphipod habitats, on which shredding or fractionating marks could be observed, were sampled in duplicate: leaves in fine gravel habitats, showing signs of an advance bacterial and fungal decomposition process, the same sort of leaves in fine sediments, and green leaves, immerged and showing fractionation marks. Pools of five adult gammarids measuring about 10 mm were sampled at the sampling site (height replicates). Organisms and soft parts of the leaves were dried, weighed, and then digested using a protocol described elsewhere [20].

To take into account the metal speciation in the water phase, Pellet et al. [20] showed that the waterborne Cd uptake in gammarids could be forecast on the basis of the labile Cd concentration using the diffusive gradients in thin-films technique (DGT) [25] rather than total dissolved concentration. The same holds for Cu, for which it has been shown that the labile concentration could be used to predict bioaccumulation in freshwater bryophytes [26]. Hence, the bioavailable metal concentrations in water were estimated on the sampling site by measuring the labile metal concentration using six DGT. Deployment and data processing have been described elsewhere [27]. The Cd contents of all samples were analyzed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS Varian SpectrAA-20, Les Ulis, France).

The Cd concentration in gammarids was forecast using Equation 9 under steady-state conditions[6] (the right-hand side of Equation 9 is the sum of the dietborne contribution and the waterborne contribution to the overall metal bioaccumulation, respectively):

Equation 9

$$[M]_{org}^{SS} = \frac{AE.IR}{k_e}.[M]_{leaves} + \frac{k_u}{k_e}[M]_w$$

where $[M]_{org}^{SS}$ is the forecast metal concentration in gammarids at steady state (µg g^{-1}), AE the metal assimilation efficiency (without units, %), IR the ingestion rate (g g^{-1} d^{-1}), k_e the elimination rate in (d^{-1}), $[M]_{leaves}$ the total metal concentration in leaves (ng g^{-1}), k_u the uptake rate from dissolved sources in (L g^{-1} d^{-1}), and $[M]_w$ is the labile metal concentration in

the water (ng L^{-1}). Cd DYM-BAM parameters were taken from Pellet et al. [20] and AEs of the present study were used. The uptake rate from dissolved sources (k_u) is unknown for gammarids exposed to Cu in freshwater. Thus, the Cu waterborne contribution could not be forecast. To forecast the dietborne contribution, we used the k_e for Cu found by Clason and Zauke [24] for collectives of euryhaline gammarids, i.e., assuming that that those gammarids and *G. pulex* share the same k_e and that the elimination rate is not influenced by salinity (assumption supported by the study of Lee et al. [28]).

RESULTS AND DISCUSSION

ICP-(CCT)-MS analytical performance

The Cd and Cu concentrations observed were in good agreement with the certified values of the reference material (mussel tissue), as shown in **Fig. 2**. Measured concentrations of Cd and Cu using the different isotopes (^{106}Cd, ^{114}Cd, ^{63}Cu, and ^{65}Cu) in SRM-1640 water and in ERM-CE 278 mussel tissue were within 7% of the reference value in CCT and in standard modes. As the reference material is not tracer-enriched, the elemental concentrations should be the same whatever the isotope used to calculate it. The determination of the Cr concentration did not depend on the isotopes in the CCT mode only. Nevertheless, the observed Cr concentrations were inferior to the referenced value with a 36% underestimation. Since the underestimation was constant from the replicate and from one isotope to another, it was attributed to an incomplete digestion of Cr. Conversely, results for Cr determination in the standard mode varied widely between replicate samples of the mussel tissue and between Cr isotopes. This variability could be interpreted as polyatomic interferences, especially (^{12}C + ^{40}Ag) on ^{52}Cr and (^{37}Cl + ^{16}O) and (^{13}C + ^{40}Ag) on ^{53}Cr.

This comparison shows that the CCT should accurately prevent isobaric interferences on Cr isotope measurements in digested invertebrates, feces, and leaves, as already observed by Hammer et al. [29] for Cr analysis in foodstuffs. The sample preparation and analytical methods used in the present study may explain the 36% underestimation of Cr concentrations in CCT mode. The certified value is determined using various analytical techniques, including the instrumental neutron activation analysis that usually

gives a 20–40% higher recovery rate than ICP-MS. Moreover, the mineralization procedure used to determine the certified values differs from that of the present study: strongly acidic, long, hot, and sometimes pressurized mineralizations are used, which could improve chromite solubilization [30]. We assumed that the underestimation (of the Cr isotopes concentrations) was the same for all samples, whatever the matrix (water, tissue, etc.), and verified that it did not impact the results: mass of leaves, net amounts of tracers and AE calculations were identical irrespective of correcting Cr concentrations for the 64% recovery rate. Net tracer values represent the key measurements when performing a pulse-chase feeding protocol with metal stable isotopes [8]. This result shows that the CCT mode improved the ICP-MS analytical determination of ^{52}Cr and ^{53}Cr concentrations and hence the determination of the net Cr tracer amounts. Consequently, further results were all based on ICP-(CCT)-MS analysis without correction for the 64% Cr recovery rate.

Tracer analysis in samples of various matrices

The concentrations of tracers initially occurring in the water a few minutes after introduction of gammarids and leaves were: [^{53}Cr] < LOD, [^{65}Cu] = 275 ± 123 ng L^{-1}, [^{106}Cd] = 2.2 ± 0.7 ng L^{-1}. At the end of the HFP, the ^{53}Cr concentration remained undetectable, [^{65}Cu] = 352 ± 114 ng L^{-1} and [^{106}Cd] = 11 ± 4 ng L^{-1}. The ^{106}Cd concentration increased significantly (Student *t*-test, p=6.10^{-6}) and the ^{65}Cu increased, but not significantly (p=0.218). As a consequence of the Cd tracer leakage, approximately 0.06 ng of ^{106}Cd may have been taken up by gammarids by dissolved uptake (considering a 9 ng L^{-1} tracer leakage, an uptake rate from the water of 0.46 L g^{-1} d^{-1} [20], a 40 mg dry weight of gammarids in the media, and the HFP of 0.31 d). This was 50 times lower than the animal body burden at the end of the depuration phase (Table S2). Thus, the contribution of water to the overall tracer accumulation was ignored in the AE calculations using Equation 8. During the depuration, concentrations of tracers in the water were: [^{53}Cr] < 1 ng L^{-1}, [^{65}Cu] = 167 ± 41 ng L^{-1}, [^{106}Cd] < 0.2 ng L^{-1} (LOD).

The stable isotope concentrations in labeled alder leaf-discs are presented in **Fig. 3**. The ratios of the tracer concentration in labeled food over that in unlabeled food were 119 (^{53}Cr), 4.7 (^{65}Cu), and 2914 (^{106}Cd). The Cu enrichment of the leaves was less than that of

other tracers. This is a consequence of both the high natural content of Cu in alder leaves, compared with Cr and Cd, and of the high natural abundance of ^{65}Cu.

Gammarids did not accumulate detectable amounts of ^{53}Cr. This was verified a posteriori that ^{53}Cr was not dietary absorbed and thus could be used as the inert tracer for digestion in gammarids. The cumulative amounts of Cr recovered in the feces (mean, 11.8 ± 3.1 ng) and the net tracer concentrations in labeled leaves (mean, 1.3 ± 0.2 µg g^{-1}) led to a mean IR of 0.69 ± 0.21 g g^{-1} d^{-1} during the HFP. During the HFP, *G. pulex* ate the quantity of food they usually take in 1 or 2 days (see Maltby et al. [19] for reference ingestion rate), probably because of the 3-days starvation period that preceded the experiment. On average, two molts were re-ingested by each group of gammarids during the depuration phase. The mass of an exuviate being approximately 2.5 mg, this represents less than 10% of the mass of the food ingested during the depuration phase. Thus, molt ingestion was not considered in further calculations and should not represent a bias of the pulse-chase feeding method. ^{65}Cu and ^{106}Cd were internalized at net tracer concentrations of, respectively, 16 ± 6 and 2.3 ± 1.2 ng g^{-1} (vs. 4 and 0.1 ng.g^{-1} in the control treatments).

The three tracers were nearly completely defecated by gammarids (>95%) within the first three time steps (see **Fig. 4**) and the initial feces (at 4 h of cold-feeding) contained as much as 82% of the net ^{53}Cr amounts recovered during the experiment. Afterwards, a sharp decrease in the fecal tracer content was observed within the first 2 days. The GRT was 24 h. It is three times less than what was expected on the basis of previous studies. This value is similar to that in the snail *Lymnaea stagnalis* (22.5 h, [8]). The high contribution of the first sample of feces to the overall fecal contamination hints at the fact that gammarids began to excrete tracers before 9 h. Thus, the gut time passage could not be precisely determined by the present study, yet it was obviously less than 9 h.

Cu and Cd Assimilation Efficiencies

The ratios used to calculate the AEs by the ratio method, and the corresponding AEs, are given in **Fig. 5** (the data are given in **Table S3, supplemental information**). The mean Cd AE was 39% ± 23% (significantly different from zero, U=64, p=0.00015). In most treatments, the Cu AE could not be determined by the ratio method because the ^{65}Cu/^{53}Cr ratios of the

leaf-discs were inferior to those in the feces, leading to algebraically negative values of AE. The mean of all $^{65}Cu/^{53}Cr$ ratios in leaves, 26 ± 5.7 (*n*=7), was not significantly different (*p*=0.78) from the mean $^{65}Cu/^{53}Cr$ ratio in the first feces 30 ± 11 (*n*=7). This lack of a significant difference between these ratios for Cu hinders the determination of the Cu AE using this method.

As for mass balance calculations, **Fig. 6** displays the net amounts of ^{65}Cu and ^{106}Cd ingested (input), defecated, and internalized in gammarids (outputs), or leaked into the water during the hot feeding. The net ^{65}Cu amounts ingested by gammarids were systematically 50% lower than the outputs, approximately 95% of which was defecated ^{65}Cu (see Fig. 6 and Supplemental Table S2). Consequently, the Cu AE could not be determined regardless of the calculation method used. Moreover, the net ^{106}Cd amounts ingested were significantly higher than the outputs (U-test, U=64, $p<0.001$), which prevented a precise quantification of the Cd AE. Indeed, this discrepancy in the mass balance led to significantly different AE results, whether the calculation is based on ingested and internalized ^{106}Cd amounts (AE = 6 ± 1%, *n*=7 for treatment #7 was discarded from the calculation as an outlier) or ingested and defecated ^{106}Cd amounts (AE = 41 ± 22% *n*=7, idem).

It is not surprising that this last AE estimation meets the AE calculated by the ratio method, since the net tracer amounts used in the mass balance method are derived from tracer concentrations in feces and leaves, directly linked with ICP-MS signal intensities used in the ratio method. The difference between the two methods is that defecated ^{106}Cd amounts used in the mass balance method are integrated values over the defecation phase, whereas the ratio method was based in the present study only on the first time step of the defecation phase. Yet, as most of the tracer was recovered in feces of the first time step, AE calculations yielded similar results.

When attributed to the other outputs in the mass balance (internalized and defecated ^{106}Cd amounts), ^{106}Cd inputs and outputs were not significantly different (U=48, $p>0.05$). To account for that, one may note that liquid excretion by gammarids and Cd leakage from the feces could have occurred, supporting the hypothesis of minimal Cd AE (6%). Nevertheless, the origin of the Cd leakage could not be unambiguously determined by the present study. Measuring the leaf-disc tracer contents before and after the HPC would

have given valuable indications on the source of the leakage. All things considered, we estimated that the Cd AE was approximately 23%, median value within the 6–40% range.

The ^{65}Cu mass balance disequilibrium shows that either the ^{65}Cu content of the feces was overestimated or that in labeled leaves was underestimated. The first possibility was rejected since neither feces from the control experiment nor blank values of the filtration method were contaminated in ^{65}Cu. Hence, a ^{65}Cu underestimation in leaves most probably occurred. The most plausible bias was an analytical inaccuracy, i.e., a matrix effect on Cu measurements in ICP-(CCT)-MS. In our opinion, a specific and reinforced digestion procedure for determination of trace level metallic isotopes in the labeled leaf matrix, following the recommendations of Lamberty and Muntau [30], would have improved ^{65}Cu determination.

Cu AE values are scarce in the literature because of a lack of suitable radiotracer [21]. Hence, one important goal of the present study was to test the feasibility of using ^{65}Cu to trace Cu assimilation in an amphipod. Even though both methods employed failed to determine the Cu AE, ^{65}Cu was internalized: in all treatments, $\Delta Q^{65}Cu$ in gammarids was significantly higher than in the control treatments. Thus, Cu AE could not be interpreted as null. Alternatively, we estimated Cu AE from the ^{65}Cu concentration in feces and the internalized ^{65}Cu using Equation 10 (this calculation method has been previously employed for determining metals AE in daphnids [31]):

Equation 10

$$AE = \frac{\Delta Q^{65}Cu_{org} + \sum \Delta Q^{65}Cu_{feces}}{\sum \Delta Q^{65}Cu_{feces}}$$

In Equation 10, internalized Cu has to be considered at the end of the tracer passage in the digestive tract (i.e., on day 2 in the present study, since the GRT was 1 day). Internalized Cu concentrations measured at day 7 were corrected using an 80% correction factor, assuming a Cu elimination rate of 10% per day [24]. Corrected from this factor, the mean Cu AE was 6% ± 3% (n=8).

The Cd and Cu AE for *G. pulex* (of 72% and 21%, respectively) are both lower than those for the other amphipod *Mysis relicta*, and the tracer defecation kinetics in Mysids

occurs with an approximate GRT of 2 days [10]. Higher AEs of metals are generally associated with longer food processing (longer GRT) [9,32]. Thus, the AE of the present study may have been influenced by the rapid food processing due to the starvation period preceding the experiment. Additionally, given the 1-d GRT for *G. pulex*, the depuration phase should have been stopped after 3 d instead of 7 d: the determination of internalized Cu would have been more accurate since Cu is eliminated within a characteristic time of 7 d. Gammarids in the field withstand starvation periods of more than 10 d [22] and can store food in their midgut [14]; hence their GTP is plausibly variable. Therefore, the influence of the GTP on metal AE in gammarids may deserve further investigation. Lastly, we note that *G. pulex* Cu AE was inferior to Cd AE and that the same observation was made on *Mysis relicta* [10], using a different diet both in terms of quality (zooplankton instead of leaves) and labeling technique. The higher assimilation of Cd could be linked with the very high calcium requirements for gammarids. Indeed, Cd and Ca have been shown to share common transportation systems in several biological interfaces [33,34].

Waterborne uptake vs dietborne uptake forecast

Cd and Cu labile concentrations in situ and the metallic content of leaves are given in **Table 1**, along with the parameters and subsequent body-burden forecasts using the DYM-BAM. Green leaves showed less Cd and Cu contamination than the decomposing leaves sampled on gravels and sediments (cf. minimal and maximal contamination hypotheses in Table 1) leading to two sets of forecasts for the dietborne contribution to the overall Cd bioaccumulation. Levels of 29–467 ng g^{-1} of Cd and 1–3 µg g^{-1} of Cu were predicted to be dietarily accumulated by gammarids.

The Cu dietborne contribution is two orders of magnitude lower than the observed Cu body burden, hence Cu may be taken up by *G. pulex* predominantly by the waterborne exposure pathway. It was not possible to predict Cu waterborne uptake and, hence, not possible to confirm this statement. The Cd minimal dietborne contribution equals a third of the observed Cd body burden. It tends to show that Cd is bioaccumulated via both uptake pathways (water and dietary sources) by gammarids. In line with this statement, the waterborne contribution is lower than the minimal Cd dietborne contribution calculated by the DYM-BAM.

That dietborne uptake pathway could significantly contribute to Cd bioaccumulation in freshwater gammarids was previously hypothesized by Abel and Barlöcher [35] and is substantiated by the present study. One may note that the dietborne contribution, under the assumption that the most metal-contaminated leaves are eaten, is four times higher than the observed Cd body burden and therefore an obvious overestimation. This hints that gammarids in situ could eat in reality fewer (or less rapidly) metal-contaminated leaves. Such food-avoidance behavior has been demonstrated for *G. pulex* toward Zn-contaminated leaves [36] and deserves further investigation.

Conclusion

A methodological adaptation of the pulse-chase feeding method using stable isotope tracers was investigated, and Cd and Cu AEs for *G. pulex* feeding on alder leaves were estimated. The use of CCT in ICP-MS analysis greatly improved the quantification of Cr isotopes: it allows reliable net tracer ^{53}Cr determinations in unlabeled and labeled samples. The pulse-chase feeding protocol using metal stable isotopes is robust to the large modifications/adaptations that the physiological characteristics of each species require. For the amphipod *G. pulex* feeding on conditioned alder leaves, the Cd assimilation efficiency was approximately 23%, within the range 6–40%. We estimated an assimilation efficiency of 6% for Cu. Analytical difficulties were encountered with ^{65}Cu (a probable matrix effect of the leaf-discs), which may be surmounted by adapting the digestion procedure to the various matrices involved in the experiment. Field observations were compatible with DYM-BAM forecasts for Cd, which strengthen the 23% Cd estimation. Comparisons between observed Cd body burden in gammarids and dietborne contributions (model forecasts) provide a first line of evidence that dietborne uptake in situ significantly contributes to the overall bioaccumulation of Cd. For Cu, dietborne uptake is likely to contribute only to a small proportion of the observed body burden according to the AE of the present study and our field observations. AE values of the present study should be used in situations where food, conditioned leaves in particular, is available ad libitum to gammarids. *G. pulex* is a promising study organism for basic research on dietborne availability of trace metals in aquatic ecosystems since it has a large food spectrum and adopts various types of feeding behavior within different physical and ecological conditions.

Acknowledgement

The present study was funded by the PIREN-Seine Research project, the French National Agency for Water and Aquatic Environments (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques), and B.P. acknowledges a grant from AgroParisTech - Ecole Nationale du Génie Rural des Eaux et des Forêts. We thank Celine Lacour and Emmanuelle Uher for their technical assistance, as well as Marie-Noële Croteau for her advice.

REFERENCES

1. Meyer JS, Adams WJ, Brix KV, Luoma SN, Mount DR, Stubblefield WA, Wood CM. 2005. *Toxicity of Dietborne Metals to Aquatic Organisms*. SETAC Press, Pensacola.

2. Luoma SN, Rainbow PS. 2005. Why is Metal Bioaccumulation So Variable ? Biodynamics as a unifying concept. *Environ Sci Technol* 39:1921-1931.

3. Wang WX, Fisher NS. 1999. Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: A synthesis. *Environ Toxicol Chem* 18:2034-2045.

4. Schlekat CE, Decho AW, Chandler GT. 2000. Bioavailability of particle-associated silver, cadmium, and zinc to the estuarine amphipod Leptocheirus plumulosus through dietary ingestion. *Limnol Oceanogr* 45:11-21.

5. Calow P, Fletcher CR. 1972. A new radiotracer technique involving ^{14}C and ^{51}Cr, for estimating the assimilation efficiencies of aquatic, primary consumers. *Oecologia* 9:155-170.

6. Luoma SN, Johns C, Fisher NS, Steinberg NA, Oremland RS, Reinfelder JR. 1992. Determination of Selenium Bioavailability to a Benthic Bivalve from Particulate and Solute Pathways. *Environ Sci Technol* 26:485-491.

7. Croteau MN, Luoma SN. 2005. Delineating copper accumulation pathways for the freshwater bivalve Corbicula using stable copper isotopes. *Environ Toxicol Chem* 24:2871-2878.

8. Croteau M-N, Luoma SN, Pellet B. 2007. Determining metal assimilation efficiency in aquatic invertebrates using enriched stable metal isotope tracers. *Aquat Toxicol* 83:116-125.

9. Roditi HA, Fisher NS. 1999. Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. *Limnol Oceanogr* 44:1730-1749.

10. Smokorowski KE, Lasenby DC, Evans RD. 1998. Quantifying the uptake and release of cadmium and copper by the opossum shrimp Mysis relicta preying upon the cladoceran Daphnia magna using stable isotope tracers. *Can J Fish Aquat Sci* 55:909-916.

11. Tanner SD, Baranov VI, Bandura DR. 2002. Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 57:1361-1452.

12. Nixon DE, Butz J, Eckdahl SJ, Burritt MF, Neubauer KR. 2000. Determination of Chromium in Serum and Urine, in *Perkin Elmer Instruments application note D6356 AN*, Shelton, CT.

13. Fialkowski W, Fialkowska E, Smith BD, Rainbow PS. 2003. Biomonitoring survey of trace metal pollution in streams of a catchment draining a zinc and lead mining area of Upper Silesia, Poland using the amphipod Gammarus fossarum. *International Review of Hydrobiology* 88:187-200.

14. Correia AD, Pereira AL, Costa MH, Carrapico F. 2002. Functional anatomy of the midgut gland of Gammarus locusta (Crustacea : Amphipoda). *J Mar Biol Assoc U K* 82:201-204.

15. Fielding NJ, MacNeill C, Dick JTA, Elwood RW, Riddell GE, Dunn AM. 2003. Effects of the acanthocephalan parasite Echinorhynchus truttae on the feeding ecology of Gammarus pulex (Crustacea : Amphipoda). *Journal of Zoology* 261:321-325.

16. De Lange HJ, Lurling M, Van den Borne B, Peeters E. 2005. Attraction of the amphipod Gammarus pulex to water-borne cues of food. *Hydrobiologia* 544:19-25.

17. Graca MAS, Cressa C, Gessner MO, Feio MJ, Callies KA, Barrios C. 2001. Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. *Freshwater Biol* 46:947-957.

18. Graca MAS, Maltby L, Calow P. 1993. Importance of Fungi in the Diet of Gammarus-Pulex and Asellus-Aquaticus .2. Effects on Growth, Reproduction and Physiology. *Oecologia* 96:304-309.

19. Maltby L, Clayton SA, Wood RM, McLoughlin N. 2002. Evaluation of the Gammarus pulex in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance. *Environ Toxicol Chem* 21:361-368.

20. Pellet B, Geffard O, Kermoal T, Lacour C, Gourlay C, Tusseau-Vuillemin MH. 2009. A model predicting waterborne Cd bioaccumulation in Gammarus pulex: the effects of dissolved organic ligands, calcium and temperature. *Environ Toxicol Chem*:in press.

21. Croteau MN, Luoma SN, Topping BR, Lopez CB. 2004. Stable metal isotopes reveal copper accumulation and loss dynamics in the freshwater bivalve corbicula. *Environ Sci Technol* 38:5002-5009.

22. Felten V. 2003. *Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophysiologie de Gammarus fossarum Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda) : approche intégrée à différents niveaux d'organisation.* Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits Environnement, ed.: Metz University. p 340.

23. Werner I. 2000. Faecal pellet production by Arctic under-ice amphipods - transfer of organic matter through the ice/water interface. *Hydrobiologia* 426:89-96.

24. Clason B, Zauke GP. 2000. Bioaccumulation of trace metals in marine and estuarine amphipods: evaluation and verification of toxicokinetic models. *Can J Fish Aquat Sci* 57:1410-1422.

25. Davison W, Zhang H. 1994. In-Situ Speciation Measurements of Trace Components in Natural-Waters Using Thin-Film Gels. *Nature* 367:546-548.

26. Ferreira D, Tousset N, Ridame C, Tusseau-Vuillemin MH. 2008. More than inorganic copper is bioavailable to aquatic mosses at environmentally relevant concentrations. *Environ Toxicol Chem* 27:2108-2116.

27. Tusseau-Vuillemin MH, Gourlay C, Lorgeoux C, Mouchel JM, Buzier R, Gilbin R, Seidel JL, Elbaz-Poulichet F. 2007. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Sci Total Environ* 375:244-256.

28. Lee BG, Wallace WG, Luoma SN. 1998. Uptake and loss kinetics of Cd, Cr and Zn in the bivalves Potamocorbula amurensis and Macoma balthica: effects of size and salinity. *Mar Ecol Prog Ser* 175:177-189.

29. Hammer D, Nicolas M, Andrey D. 2005. Improved chromium determination in various food matrices using dynamic reaction cell ICP-MS. *At Spectrosc* 26:203-208.

30. Lamberty A, Muntau H. 2005. *The certification of the mass fraction of As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se and Zn in mussel tissue (mytilus edulis) -ERM®-CE278,* in Scientific and Technical Research series EUR 18840, p 49. DG Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Luxembourg

31. Yu R-Q, Wang W-X. 2004. Biokinetics of cadmium, selenium, and zinc in freshwater alga Scenedesmus obliquus under different phosphorus and nitrogen conditions and metal transfer to Daphnia magna. *Environ Pollut* 129:443-456.

32. Decho AW, Luoma SN. 1996. Flexible digestion strategies and trace metal assimilation in marine bivalves. *Limnol Oceanogr* 41:568-572.

33. Croteau MN, Luoma SN. 2007. Characterizing Dissolved Cu and Cd Uptake in Terms of the Biotic Ligand and Biodynamics Using Enriched Stable Isotopes. *Environ Sci Technol* 41:3140-3145.

34. Simkiss K, Taylor MG. 2001. Trace element speciation at cell membranes: aqueous, solid and lipid phase effects. *J Environ Monit* 3:15-21.

35. Abel T, Bärlocher F. 1988. Uptake of cadmium by *Gammarus fossarum* (Amphipoda) from food and water. *J Appl Ecol* 25:223-231.

36. Wilding J, Maltby L. 2006. Relative toxicological importance of aqueous and dietary metal exposure to a freshwater crustacean: implications for risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 25:1795-1801.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic representation of the determination of a tracer assimilation efficiency (AE) using the mass balance calculation and the pulse-chase feeding protocol. AE was arbitrary fixed at 50%. The calculation method is based on the net tracer amounts ingested, defecated, and internalized in gammarids. Assuming that the tracer abundance is one-third (p^{tracer}=0.33 with the notations of the text) and that only one secondary isotope exists, four units of tracer (closed circles, net amount of tracer) are ingested, which, after the pulse feeding, shows two net tracer units in the feces and two in the gammarids. All mass balance calculations other than that using net tracer amounts in the three organic matrices are flawed, given that the two isotopes are initially present in the gammarids tissues (one unit of tracer) and the leaf-discs (two units of tracer). The bars illustrate the calculations made when using Equation 5 to determine the net tracer amounts in all organic samples.

Figure 2. The use of the collision cell technology (CCT) improves Cr analysis regularity among its various isotopes. Recovery rates of Cr, Cu, and Cd in the reference material mussel tissue (ERM-CE-278) were inferred from various isotopes of Cr, Cu, and Cu and expressed as a percentage of the certified value. The squares represent the mean of the two duplicate samples (circles). Empty circles represent the results in standard mode and filled circles those in CCT mode. ND stands for not determined (the ^{53}Cr signal in standard mode for one sample was inferior to the blank value).

Figure 3. Tracer and elemental composition of unlabeled and labeled alder leaf-discs. White bars: discs labeled with the three tracers, mean value (*n*=7). Gray bars, unlabeled discs. Mean value ± SD (*n*=10).

Figure 4. Time series of the fecal tracer release (%). Mean ± SD (*n*=8) of normalized fecal release (by the sum of the defecated tracer amounts) for each tracer during the depuration phase. The time is counted from the start of the experiment. Depuration began at *t*=7.45 h. ○ ^{106}Cd, ▯ ^{65}Cu, ◊ ^{53}Cr.

Figure 5. Assimilation efficiency (AE) determined by the ratio method, based on ^{65}Cu/^{53}Cr intensities in the first feces released (striped bars) and in labeled leaf-discs (white bars), idem for ^{106}Cd/^{53}Cr, and see Equation 8 for the calculation method. Black dots indicate the AE (for Cd only, secondary y-axis). Abbrev: C1 and C2 stand for control treatments, the eight other treatments were numbered. Control treatment data for Cu are not represented since the corresponding ratios are one to two orders of magnitude higher than those of the other treatment (see Supplemental Information for the data table).

Figure 6. Comparison of the net tracer amounts in ingested leaf-discs ($\Delta^{i}EQ_{LL}$), in gammarid tissue at the end of the experiment ($\Delta^{i}EQ_{org}$), and of cumulative amounts recovered in the feces during the depuration phase ($\Sigma\Delta^{i}EQ_{feces}$). The mass balance is checked when the white bar ($\Delta^{i}EQ_{LL}$) equals the sum of the black ($\Delta^{i}EQ_{org}$) and the dashed bars ($\Sigma\Delta^{i}EQ_{feces}$). The net ^{106}Cd amount that leaked in the water (ΔQ_{LE}) is indicated in the same scale of the Cd histogram above.

Field observations				Cd	Cu	*n*=
Leaf concentration	$[M]_{leaves}$	µg g^{-1}	min	0.04 ± 0.02	22 ± 2	4
		µg g^{-1}	max	0.65 ± 0.29	44 ± 6	2
Water labile concentration	$[M]_w$	ng L^{-1}		1 ± 0.3	0.38 ± 0.12	2
G. pulex body burden	$[M]_{org}$	µg g^{-1}		**0.11** ± 0.03	**100** ± 6	8
Model				Cd	Cu	
Assimilation efficiency	AE	%		23	6	
Ingestion rate	IR	g g^{-1} d^{-1}		0.1	0.1	
Uptake rate from water	k_u	L g^{-1} d^{-1}		0.40	ND	
Elimination rate	k_e	d^{-1}		0.032	0.1	
Body-burden forecasts (sum of the two terms below)	$[M]_{org}^{SS}$	µg g^{-1}	min	**0.041**	ND	
		µg g^{-1}	max	0.480	ND	
Dietborne contribution		µg g^{-1}	min	**0.029**	**1.3**	
		µg g^{-1}	max	0.467	2.6	
Waterborne contribution		µg g^{-1}		**0.013**	ND	

Table 1. Biodynamic forecasts of Cd and Cu bioaccumulation in *G. pulex*. $[M]_w$ is the labile metal concentration measured by the diffusive gradient in thin-film technique. $[M]_{org}^{SS}$ is the forecast at the steady-state of the Cd and Cu body burden in *G. pulex* using Equation 9. Max and min figures correspond to the maximal and minimal contaminations of the food and the subsequent results in terms of dynamic multi-pathway bioaccumulation modeling. The following sources of data were used: Pellet et al. [20] Cd uptake rate from water at 78 mg.L^{-1} calcium and Cd elimination rate, Clason and Zauke [24] Cu elimination rate, Maltby et al. [19] ingestion rate at 14°C, and AEs are from the present study. Whenever indicated, means are given with ± standard deviations and *n* is the number of replicates. Bold type underlines the principal figures discussed in the text.

VI. BIBLIOGRAPHIE

(2000). Directive n° 2000/60/CE du 23/10/00 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau, Journal officiel de l'Union Européenne n° L 327 du 22 décembre 2000. **2000/60/CE**.

(2008). DIRECTIVE 2008/105/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE., Journal officiel de l'Union Européenne. **2008/105/CE:** 14.

Abel, T. and F. Bärlocher (1988). "Uptake of cadmium by *Gammarus fossarum* (Amphipoda) from food and water." *J Appl Ecol* **25**: 223-231.

Alouf, N. J. (1983). "Cycle de vie de Gammarus laticoxalis ssp. dans l'exsurgence Shtaura (Liban). Note sur Gammarus syriacus de Shamsine." *Hydrobiologia* **107**(2): 169-181.

Amyot, M., B. Pinel-Alloul, P. G. C. Campbell and J. C. Desy (1996). "Total metal burdens in the freshwater amphipod Gammarus fasciatus: Contribution of various body parts and influence of gut contents." *Freshw Biol* **35**(2): 363-373.

Anderson, M. A. and F. M. M. Morel (1982). "The Influence of Aqueous Iron Chemistry on the Uptake of Iron by the Coastal Diatom Thalassiosira-Weissflogii." *Limnol Oceanogr* **27**(5): 789-813.

Anderson, M. A., F. M. M. Morel and R. R. L. Guillard (1978). "Growth limitation of a coastal diatom by low zinc ion activity." *Nature* **276**(5683): 70-71.

Barles, S. (2007). "Urban metabolism and river systems: an historical perspective - Paris and the Seine, 1790-1970." *Hydrology and Earth System Sciences* **11**(6): 1757-1769.

Barron, M. G., G. R. Stehly and W. L. Hayton (1990). "Pharmacokinetic modeling in aquatic animals I. Models and concepts." *Aquat Toxicol* **18**(2): 61-85.

Bascombe, A. D., J. B. Ellis, D. M. Revitt and R. B. E. Shutes (1990). "The Development of Ecotoxicological Criteria in Urban Catchments." *Water Sci Technol* **22**(10-11): 173-179.

Benedetti, M. F., C. J. Milne, D. G. Kinniburgh, W. H. Van Riemsdijk and L. K. Koopal (1995). "Metal Ion Binding to Humic Substances: Application of the Non-Ideal Competitive Adsorption Model." *Environ Sci Technol* **29**(2): 446-457.

Benedetti, M. F., W. H. Van Riemsdijk, L. K. Koopal, D. G. Kinniburgh, D. C. Gooddy and C. J. Milne (1996). "Metal ion binding by natural organic matter: From the model to the field." *Geochim Cosmochim Acta* **60**(14): 2503-2513.

Bervoets, L., R. Blust and R. Verheyen (1995). "The uptake of cadmium by the midge larvae Chironomus riparius as a function of salinity." *Aquat Toxicol* **33**(3-4): 227-243.

Bervoets, L. and R. V. R. Blust (1996). "Effect of Temperature on Cadmium and Zinc Uptake by the Midge Larvae Chironomus riparius." *Arch Environ Contam Toxicol* **31**(4): 502-511.

Bervoets, L., J. Voets, S. Chu, A. Covaci, P. Schepens and R. Blust (2004). "Comparison of accumulation of micropollutants between indigenous and transplanted zebra mussels (Dreissena polymorpha)." *Environ Toxicol Chem* **23**(8): 1973-1983.

Bervoets, L., J. Voets, A. Covaci, S. Chu, D. Qadah, R. Smolders, P. Schepens and R. Blust (2005). "Use of Transplanted Zebra Mussels (Dreissena polymorpha) To Assess the Bioavailability of Microcontaminants in Flemish Surface Waters." *Environ Sci Technol* **39**(6): 1492-1505.

Birge, W. J., D. J. Price, J. R. Shaw, J. A. Spromberg, A. J. Wigginton and C. Hogstrand (2000). "Metal body burden and biological sensors as ecological indicators." *Environ Toxicol Chem* **19**(4): 1199-1212.

Bollache, L., S. Devin, R. Wattier, M. Chovet, J. N. Beisel, J. C. Moreteau and T. Rigaud (2004). "Rapid range extension of the Ponto-Caspian amphipod Dikerogammarus villosus in France: potential consequences." *Archiv Fur Hydrobiologie* **160**(1): 57-66.

Bruner, K. A., S. W. Fisher and P. F. Landrum (1994). "The Role of the Zebra Mussel, Dreissena-Polymorpha, in Contaminant Cycling .2. Zebra Mussel Contaminant Accumulation from Algae and Suspended Particles, and Transfer to the Benthic Invertebrate, Gammarus-Fasciatus." *J Gt Lakes Res* **20**(4): 735-750.

Bryan, G. W. and W. J. Langston (1992). "Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review." *Environ Pollut* **76**(2): 89-131.

Buchwalter, D. B. and S. N. Luoma (2005). "Differences in dissolved cadmium and zinc uptake among stream insects: Mechanistic explanations." *Environ Sci Technol* **39**(2): 498-504.

Buffle, J., R. S. Altmann and M. Filella (1990). "Effect of physico-chemical heterogeneity of natural complexants : Part II. Buffering action and role of their background sites." *Anal Chim Acta* **232**: 225-237.

Buffle, J. and M. Filella (1995). "Physico-chemical heterogeneity of natural complexants: Clarification." *Anal Chim Acta* **313**(1-2): 144-150.

Buzier, R., M.-H. Tusseau-Vuillemin, C. M. dit Meriadec, O. Rousselot and J.-M. Mouchel (2006a). "Trace metal speciation and fluxes within a major French wastewater treatment plant: Impact of the successive treatments stages." *Chemosphere* **65**(11): 2419-2426.

Buzier, R., M. H. Tusseau-Vuillemin and J. M. Mouchel (2006b). "Evaluation of DGT as a metal speciation tool in wastewater." *Sci Total Environ* **358**(1-3): 277-285.

Calow, P. and C. R. Fletcher (1972). "A new radiotracer technique involving 14C and 51Cr, for estimating the assimilation efficiencies of aquatic, primary consumers." *Oecologia* **9**(2): 155-170.

Campbell, P. G. C. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms : a critique of the Free Ion Activity Model. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. A. Tessier and D. R. Turner, John Wiley & sons Ltd**:** 45-102.

Casas, S. (2005). Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, Mytilus Galloprovincialis, en milieu méditerranéen. Océanologie biologique, Environnement marin. Toulon, Univsersité du Sud Toulon Var. **Thèse de doctorat**.

Casiot, C., M. Leblanc, O. Bruneel, J. C. Personne, K. Koffi and F. Elbaz-Poulichet (2003). "Geochemical processes controlling the formation of As-rich waters within a tailings impoundment (Carnoule?s, France)." *Aquatic Geochemistry* **9**(4): 273-290.

Chang, S. I. and J. R. Reinfelder (2000). "Bioaccumulation, subcellular trophic copper in a coastal marine diatom." *Environ Sci Technol* **34**(23): 4931-4935.

Chang, S. I. and J. R. Reinfelder (2002). "Relative importance of dissolved versus trophic bioaccumulation of copper in marine copepods." *Marine Ecology-Progress Series* **231**: 179-186.

Chapman, D. (1992). Introduction : Water Quality Assessments. Water Quality Assessments. C. Hall. London**:** 8-11.

Chaumot, A. (2008). Quantitative genetics meets ecotoxicology to assess the ability of adaptation to contaminated environments: lessons from one assay with Gammarus pulex. SETAC Europe annual meeting 2008, Warsaw, SETAC.

Chen, D., P.-Y. Qian and W.-X. Wang (2008). "Biokinetics of cadmium and zinc in a marine bacterium: influences of metal interaction and pre-exposure." *Environ Toxicol Chem* **27**(8): 1794-1801.

Chowdhury, M. J., C. Bucking and C. M. Wood (2008). "Is Nickel an Essential Metal for Aquatic Animals." *Integrated Environmental Assessment and Management* **4**(2): 266-267.

Clason, B., S. Duquesne, M. Liess, R. Schulz and G. P. Zauke (2003). "Bioaccumulation of trace metals in the Antarctic amphipod Paramoera walkeri (Stebbing, 1906): comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models." *Aquat Toxicol* **65**(2): 117-140.

Clason, B., B. Gulliksen and G. P. Zauke (2004). "Assessment of two-compartment models as predictive tools for the bioaccumulation of trace metals in the amphipod Gammarus oceanicus Segerstrale, 1947 from Grunnfjord (Northern Norway)." *Sci Total Environ* **323**(1-3): 227-241.

Clason, B. and G. P. Zauke (2000). "Bioaccumulation of trace metals in marine and estuarine amphipods:

evaluation and verification of toxicokinetic models." *Can J Fish Aquat Sci* **57**(7): 1410-1422.

Correia, A. D., A. L. Pereira, M. H. Costa and F. Carrapico (2002). "Functional anatomy of the midgut gland of Gammarus locusta (Crustacea : Amphipoda)." *J Mar Biol Assoc U K* **82**(2): 201-204.

Croisetiere, L., L. Hare and A. Tessier (2006). "A field experiment to determine the relative importance of prey and water as sources of As, Cd, Co, Cu, Pb, and Zn for the aquatic invertebrate Sialis velata." *Environ Sci Technol* **40**(3): 873-879.

Croteau, M.-N., S. N. Luoma and B. Pellet (2007a). "Determining metal assimilation efficiency in aquatic invertebrates using enriched stable metal isotope tracers." *Aquat Toxicol* **83**(2): 116-125.

Croteau, M.-N. and S. N. Luoma (2008). "A Biodynamic Understanding of Dietborne Metal Uptake by a Freshwater Invertebrate." *Environ Sci Technol* **42**(5): 1801-1806.

Croteau, M. N., L. Hare and A. Tessier (2002). "Influence of temperature on Cd accumulation by species of the biomonitor Chaoborus." *Limnol Oceanogr* **47**(2): 505-514.

Croteau, M. N. and S. N. Luoma (2007b). "Characterizing Dissolved Cu and Cd Uptake in Terms of the Biotic Ligand and Biodynamics Using Enriched Stable Isotopes." *Environ Sci Technol* **41**(9): 3140-3145.

Croteau, M. N., S. N. Luoma, B. R. Topping and C. B. Lopez (2004). "Stable metal isotopes reveal copper accumulation and loss dynamics in the freshwater bivalve corbicula." *Environ Sci Technol* **38**(19): 5002-5009.

Cummins, K. W., R. C. Petersen, F. O. Howard, J. C. Wuycheck and V. I. Holt (1973). "The Utilization of Leaf Litter by Stream Detritivores." *Ecology* **54**(2): 336-345.

Davison, W. (1978). "Defining the electroanalytically measured species in a natural water sample." *J Electroanal Chem* **87**: 395-404.

Davison, W. and H. Zhang (1994). "In-Situ Speciation Measurements of Trace Components in Natural-Waters Using Thin-Film Gels." *Nature* **367**(6463): 546-548.

De Lange, H. J., M. Lurling, B. Van den Borne and E. Peeters (2005). "Attraction of the amphipod Gammarus pulex to water-borne cues of food." *Hydrobiologia* **544**: 19-25.

De Schamphelaere, K. A. C. and C. R. Janssen (2002). "A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for Daphnia magna: The effects of calcium, magnesium, sodium, potassium, and pH." *Environ Sci Technol* **36**(1): 48-54.

De Schamphelaere, K. A. C., F. M. Vasconcelos, F. M. G. Tack, H. E. Allen and C. R. Janssen (2004). "Effect of dissolved organic matter source on acute copper toxicity to Daphnia magna." *Environ Toxicol Chem* **23**(5): 1248-1255.

Decho, A. W. and S. N. Luoma (1996). "Flexible digestion strategies and trace metal assimilation in marine bivalves." *Limnol Oceanogr* **41**(3): 568-572.

Di Toro, D. M., H. E. Allen, H. L. Bergman, J. S. Meyer, P. R. Paquin and R. C. Santore (2001). "BIOTIC LIGAND MODEL OF THE ACUTE TOXICITY OF METALS. 1. TECHNICAL BASIS." *Environ Toxicol Chem* **20**(10): 2383-2396.

Dufailly, V., L. Noel and T. Guerin (2006). "Determination of chromium, iron and selenium in foodstuffs of animal origin by collision cell technology, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), after closed vessel microwave digestion." *Anal Chim Acta* **565**(2): 214-221.

Eimers, M. C., R. D. Evans and P. M. Welbourn (2001). "Cadmium accumulation in the freshwater isopod Asellus racovitzai: the relative importance of solute and particulate sources at trace concentrations." *Environ Pollut* **111**(2): 247-253.

Elbaz-Poulichet, F., J.-L. Seidel, C. Casiot and M.-H. Tusseau-Vuillemin (2006). "Short-term variability of dissolved trace element concentrations in the Marne and Seine Rivers near Paris." *Sci Total Environ* **367**(1): 278-287.

Elliott, J. M. (2002). "A continuous study of the total drift of freshwater shrimps, <i>Gammarus pulex</i>, in a small stony stream in the English Lake District." *Freshw Biol* **47**(1): 75-86.

Evans, W. H., N. C. Thomas, M. C. Boardman and S. J. Nash (1993). "Relationships of polycyclic aromatic hydrocarbon yields with particulate matter (water and nicotine free) yields in mainstream and sidestream cigarette smoke." *Sci Total Environ* **136**(1-2): 101-109.

Felten, V. (2003). Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophysiologie de Gammarus fossarum Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda) : approche intégrée à différents niveaux d'organisation. Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits Environnement, Metz University**:** 340.

Felten, V., G. Charmantier, R. Mons, A. Geffard, P. Rousselle, M. Coquery, J. Garric and O. Geffard (2008). "Physiological and behavioural responses of Gammarus pulex (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium." *Aquat Toxicol* **86**(3): 413-425.

Ferreira, D., M. H. Tusseau-Vuillemin, N. Tousset and C. Ridame (2008). "More than inorganic copper is bioavailable to aquatic mosses at environmentally relevant concentrations." *Environ Toxicol Chem* **27**(10): 2108-2116.

Fialkowski, W., E. Fialkowska, B. D. Smith and P. S. Rainbow (2003). "Biomonitoring survey of trace metal pollution in streams of a catchment draining a zinc and lead mining area of Upper Silesia, Poland using the amphipod Gammarus fossarum." *International Review of Hydrobiology* **88**(2): 187-200.

Fialkowski, W. and P. S. Rainbow (2006). "The discriminatory power of two biomonitors of trace metal bioavailabilities in freshwater streams." *Water Res* **40**(9): 1805-1810.

Fielding, N. J., C. MacNeill, J. T. A. Dick, R. W. Elwood, G. E. Riddell and A. M. Dunn (2003). "Effects of the acanthocephalan parasite Echinorhynchus truttae on the feeding ecology of Gammarus pulex (Crustacea : Amphipoda)." *Journal of Zoology* **261**: 321-325.

Filella, M., D. Klockow and A. M. Mota (2001). "Metals in environmental compartments." *Fresenius J Anal Chem* **370**(7): 793-794.

Fisher, N. S., J. L. Teyssie, S. W. Fowler and W. X. Wang (1996). "Accumulation and retention of metals in mussels from food and water: A comparison under field and laboratory conditions." *Environ Sci Technol* **30**(11): 3232-3242.

Forbes, V. E. and T. L. Forbes (1997). Ecotoxicologie, théorie et applications.

Fowler, S. W., J. Rosa, M. Heyraud and W. C. Renfro (1975). "Effect of different radiotracer labelling techniques on radionuclide excretion from marine organisms." *Marine Biology* **30**(4): 297-304.

Fraboulet, S., J. M. Mouchel and D. Thevenot (1992). Impact des micropolluants métalliques sur Asellus aquaticus. PIREN Seine rapport IV/92/04. Paris, L.A.B.A.M (Laboratoire de Bioélectrochimie et d'Analyse du Milieu, Université Paris XII) et CERGRENE (Ecole Nationale des Ponts et Chaussées et Ecole Nationale du Génie Rural des Eaux et des Forêts).

Gagné, F., C. Blaise and J. Pellerin (2005). "Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean Gammarus sp. collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada." *Environ Res* **98**(1): 89-99.

Garric, J., G. Golaszewski, C. Lascombe and E. Vindimian (2001). L'apport des approches écotoxicologiques à la problématique de gestion des cours d'eau. Lyon, Agence de l'eau Rhone-Méditerranée-Corse.

Geffard, A., J. C. Amiard and C. Amiard-Triquet (2002). "Kinetics of metal elimination in oysters from a contaminated estuary." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **131**(3): 281-293.

Geffard, A., H. Queau, O. Dedourge, S. Biagianti-Risboug and O. Geffard (2007). "Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in Gammarus pulex." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **145**(4): 632-640.

Geffard, O., A. Geffard, A. Chaumot, B. Vollat, C. Alvarez, M.-H. Tusseau-Vuillemin and J. Garric (2008). "Effects of Chronic Dietary and Waterborne Cadmium Exposures on the Contamination Level and Reproduction of Daphnia magna." *Environ Toxicol Chem* **27**(5): 1128-1134.

Gimpel, J., H. Zhang, W. Davison and A. C. Edwards (2003). "In Situ Trace Metal Speciation in Lake Surface

Waters Using DGT, Dialysis, and Filtration." *Environ Sci Technol* **37**(1): 138-146.

Goedmakers, A. and S. Pinkster (1981). "Population dynamics of three gammarid species (Crustacea, Amphipoda) in French chalk stream. Part III. Migration. ." *Bijdragen Tot De Dierkunde* **51**: 145-181.

Gossiaux, D. C., P. F. Landrum and S. W. Fisher (1998). "The assimilation of contaminants from suspended sediment and algae by the zebra mussel, Dreissena polymorpha." *Chemosphere* **36**(15): 3181-3197.

Gourlay, C., M.-H. Tusseau-Vuillemin, J. Garric and J.-M. Mouchel (2003). "Effect of dissolved organic matter of various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbon in Daphnia magna." *Environ Sci Technol* **22**(6): 1288-1294.

Graca, M. A. S., C. Cressa, M. O. Gessner, M. J. Feio, K. A. Callies and C. Barrios (2001). "Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams." *Freshw Biol* **46**(7): 947-957.

Graca, M. A. S., L. Maltby and P. Calow (1993a). "Importance of Fungi in the Diet of Gammarus-Pulex and Asellus-Aquaticus .1. Feeding Strategies." *Oecologia* **93**(1): 139-144.

Graca, M. A. S., L. Maltby and P. Calow (1993b). "Importance of Fungi in the Diet of Gammarus-Pulex and Asellus-Aquaticus .2. Effects on Growth, Reproduction and Physiology." *Oecologia* **96**(3): 304-309.

Gromaire-Mertz, M. C. (2000). "Urban wet weather pollution in combined sewer networks - Characteristics and origins." *Houille Blanche-Revue Internationale De L Eau*(2): 66-70.

Guven, K., C. Uzbay, E. Unlu and A. Satar (1999). "Acute Lethal Toxicity and Acculmulation of Copper in Gammarus pulex (L.) (Amphipoda)." *Turk J Biol* **23**: 513-521.

Haitzer, M., J. Akkanen, C. Steinberg and J. V. K. Kukkonen (2001). "No enhancement in bioconcentration of organic contaminants by low levels of DOM." *Chemosphere* **44**(2): 165-171.

Haitzer, M., S. Hoss, W. Traunspurger and C. Steinberg (1998). "Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms - A review." *Chemosphere* **37**(7): 1335-1362.

Hammer, D., M. Nicolas and D. Andrey (2005). "Improved chromium determination in various food matrices using dynamic reaction cell ICP-MS." *At Spectrosc* **26**(6): 203-208.

Hassler, C. S., V. I. Slaveykova and K. J. Wilkinson (2004). "Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models." *Environ Toxicol Chem* **23**(2): 283-291.

Howell, E. T., C. H. Marvin, R. W. Bilyea, P. B. Kauss and K. Somers (1996). "Changes in environmental conditions during Dreissena colonization of a monitoring station in eastern Lake Erie." *J Gt Lakes Res* **22**(3): 744-756.

Jones, K. C. and P. de Voogt (1999). "Persistant Organic polluants (POPs): state of the science." *Environ Pollut* **100**: 209-221.

Ke, C. H. and W. X. Wang (2001). "Bioaccumulation of Cd, Se, and Zn in an estuarine oyster (Crassostrea rivularis) and a coastal oyster (Saccostrea glomerata)." *Aquat Toxicol* **56**(1): 33-51.

Kendall, A., D. W. J. Green and D. Pascoe (1985). "Studies on the acute toxicity of pollutants to freshwater macroinvertebrates." *Archiv fur Hydrobiologie* **102**(4): 461-471.

Keteles, K. A. and J. W. Fleeger (2001). "The Contribution of Ecdysis to the Fate of Copper, Zinc and Cadmium in Grass Shrimp, Palaemonetes pugio Holthius." *Mar Pollut Bull* **42**(12): 1397-1402.

Kooijman, S. and R. J. F. Vanharen (1990). "Animal Energy Budgets Affect the Kinetics of Xenobiotics." *Chemosphere* **21**(4-5): 681-693.

Koukal, B., C. Guéguen, M. Pardos and J. Dominik (2003). "Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga Pseudokirchneriella subcapitata." *Chemosphere* **53**(8): 953-961.

Kukkonen, J. and P. F. Landrum (1995a). "Effects of Sediment-Bound Polydimethylsiloxane on the Bioavailability and Distribution of Benzo[a]Pyrene in Lake Sediment to Lumbriculus-Variegatus." *Environ Toxicol Chem* **14**(3): 523-531.

Kukkonen, J. and P. F. Landrum (1995b). "Measuring assimilation efficiencies for sediment-bound PAH and PCB congeners by benthic organisms." *Aquat Toxicol* **32**(1): 75-92.

Kutlu, M., A. Duzen, C. Baycu and A. Ozata (2002). "A transmission electron microscope investigation of the effect of lead acetate on the hepatopancreatic ceca of Gammarus pulex." *Environ Toxicol Pharmacol* **12**(3): 181-187.

Lacour, C. (2006). Interprétation de la bioaccumulation du cadmium par *Gammarus pulex* en fonction de la chimie du milieu. r. d. master. Créteil, Université Paris XII-val de marne**:** 45 p.

Lamberty, A. and H. Muntau (2005). The certification of the mass fraction of As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se and Zn in mussel tissue (mytilus edulis) -

ERM®-CE278. Scientific and Technical Research series. O. f. O. P. o. t. E. Communities. Luxembourg, EUR 18840 – DG Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements**:** 49.

Landrum, P. F. (1988). "Toxicokinetics of organic xenobiotics in the amphipod *Pontoporeia hoyi*: role of physiological and environmental variables." *Aquat Toxicol*(12): 245-271.

Landrum, P. F. (1998). Kinetic Models for Assessing Bioaccumulation. National Sediment Bioaccumulation Conference, proceedings. Ann Arbor, Michigan, EPA/NOAA**:** 47-49.

Landrum, P. F., H. Lee and M. J. Lydy (1992). "Toxicokinetics in Aquatic Systems - Model Comparisons and Use in Hazard Assessment." *Environ Toxicol Chem* **11**(12): 1709-1725.

Landrum, P. F., G. R. Lotufo, D. C. Gossiaux, M. L. Gedeon and J. H. Lee (2003). "Bioaccumulation and critical body residue of PAHs in the amphipod, Diporeia spp.: additional evidence to support toxicity additivity for PAH mixtures." *Chemosphere* **51**(6): 481-489.

Landrum, P. F., M. D. Reinhold, S. R. Nihart and B. J. Eadie (1985). "Predicting the Bioavailability of Organic Xenobiotics to Pontoporeia-Hoyi in the Presence of Humic and Fulvic Materials and Natural Dissolved Organic-Matter." *Environ Toxicol Chem* **4**(4): 459-467.

Landrum, P. F. and C. R. Stubblefield (1991). "Role of respiration in the accumulation of organic xenobiotics by the amphipod Diporeia sp." *Environ Toxicol Chem* **10**(8): 1019-1028.

Lane, T. W. and F. o. M. M. Morel (2000). "A biological function for cadmium in marine diatoms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4627-4631.

Lasenby, D. C. and J. Duyn (1992). "Zinc and cadmium accumulation by the opossum shrimp Mysis relicta." *Arch Environ Contam Toxicol* **23**(2): 179-183.

Lee, B. G., W. G. Wallace and S. N. Luoma (1998). "Uptake and loss kinetics of Cd, Cr and Zn in the bivalves Potamocorbula amurensis and Macoma balthica: effects of size and salinity." *Marine Ecology-Progress Series* **175**: 177-189.

Lestel, L., M. Meybeck and D. R. ThÃ©venot (2007). "Metal contamination budget at the river basin scale: an original Flux-Flow Analysis (F2A) for the Seine River." *Hydrol. Earth Syst. Sci.* **11**(6): 1771-1781.

Lotufo, G. R., P. F. Landrum, M. L. Gedeon, E. A. Tigue and L. R. Herche (2000). "Comparative toxicity and toxicokinetics of DDT and its major metabolites in freshwater amphipods." *Environ Toxicol Chem* **19**(2): 368-379.

Luider, C. D., J. Crusius, R. C. Playle and P. J. Curtis (2004). "Influence of natural organic matter source on copper speciation as demonstrated by Cu binding to fish gills, by ion selective electrode, and by DGT gel sampler." *Environ Sci Technol* **38**(10): 2865-2872.

Luoma, S. N., C. Johns, N. S. Fisher, N. A. Steinberg, R. S. Oremland and J. R. Reinfelder (1992). "Determination of Selenium Bioavailability to a Benthic Bivalve from Particulate and Solute Pathways." *Environ Sci Technol* **26**(3): 485-491.

Luoma, S. N. and P. S. Rainbow (2005). "Why is Metal Bioaccumulation So Variable ? Biodynamics as a unifying

concept." *Environ Sci Technol* **39**(7): 1921-1931.

Ma, H., S. D. Kim, D. K. Cha and H. E. Allen (1999). "Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to Ceriodaphnia dubia." *Environ Toxicol Chem* **18**(5): 828-837.

Mackay, D. and A. Fraser (2000). "Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models." *Environ Pollut* **110**(3): 375-391.

Mackay, D. and S. Paterson (1981). "Calculating fugacity." *Environ Sci Technol* **15**(9): 1006-1014.

MacNeil, C., J. T. Dick and R. W. Elwood (1997). "The trophic ecology of freshwater Gammarus spp. (Crustacea: Amphipoda): Problems and perspectives concerning the functional feeding group concept." *Biol Rev Camb Philos Soc* **72**(3): 349-364.

Maltby, L. (1999). "Studying stress: The importance of organism-level responses." *Ecol Appl* **9**(2): 431-440.

Maltby, L., S. A. Clayton, R. M. Wood and N. McLoughlin (2002). "Evaluation of the Gammarus pulex in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance." *Environ Toxicol Chem* **21**(2): 361-368.

Maltby, L. and M. Crane (1994). "Responses of Gammarus pulex (amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation " *Environ Pollut* **84**(1): 45-52.

Marigómez, I., M. Soto, M. P. Cajaraville, E. Angulo, L. Giamberini (2002). "Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs." *Microscopy Research and Technique* **56**(5): 358-392.

McCahon, C. P. and D. Pascoe (1988a). "Cadmium Toxicity to the Fresh-Water Amphipod Gammarus-Pulex (L) During the Molt Cycle." *Freshw Biol* **19**(2): 197-203.

McCahon, C. P. and D. Pascoe (1988b). "Increased sensitivity to cadmium of the freshwater amphipod Gammarus pulex (L.) during the reproductive period." *Aquat Toxicol* **13**(3): 183-193.

McCarthy, J. F. (1983a). "Role of particulate organic matter in decreasing accumulation of polynucelear aromatic hydrocarbons by Daphnia magna." *Archives Environmental Contamination and Toxicology* **12**: 559-568.

McCarthy, J. F. (1983b). "Role of particulate organic matter in decreasing accumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by Daphnia magna." *Arch Environ Contam Toxicol* **12**(5): 559-568.

McCarthy, J. F., L. E. Roberson and L. W. Burrus (1989). "Association of benzo(a)pyrene with dissolved organic matter: Prediction of Kdom from structural and chemical properties of the organic matter." *Chemosphere* **19**(12): 1911-1920.

McGee, B. L., D. A. Wright and D. J. Fisher (1998). "Biotic factors modifying acute toxicity of aqueous cadmium to estuarine amphipod Leptocheirus plumulosus." *Arch Environ Contam Toxicol* **34**(1): 34-40.

McLeod, P. B., M. J. Van Den Heuvel-Greve, R. M. Allen-King, S. N. Luoma and R. G. Luthy (2004). "Effects of particulate carbonaceous matter on the bioavailability of benzo[a]pyrene and 2,2 ',5,5 '-tetrachlorobiphenyl to the clam, Macoma balthica." *Environ Sci Technol* **38**(17): 4549-4556.

Meybeck, M., L. Lestel, P. Bonté, R. Moilleron, J. L. Colin, O. Rousselot, D. Hervé, C. de Pontevès, C. Grosbois and D. R. Thévenot (2007). "Historical perspective of heavy metals contamination (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) in the Seine River basin (France) following a DPSIR approach (1950-2005)." *Sci Total Environ* **375**(1-3): 204-231.

Meyer, J. S., W. J. Adams, K. V. Brix, S. N. Luoma, D. R. Mount, W. A. Stubblefield and C. M. Wood (2005). Toxicity of Dietborne Metals to Aquatic Organisms. Pensacola, SETAC Press.

Meylan, S., N. Odzak, R. Behra and L. Sigg (2004). "Speciation of copper and zinc in natural freshwater: comparison of voltammetric measurements, diffusive gradients in thin films (DGT) and chemical equilibrium models." *Anal Chim Acta* **510**(1): 91-100.

Meyran, J. C., M. Monnerot and P. Taberlet (1997). "Taxonomic status and phylogenetic relationships of some species of the genus gammarus (Crustacea, Amphipoda) deduced from mitochondrial DNA sequences." *Mol Phylogenet Evol* **8**(1): 1-10.

Morel, F. (1983). Principles of Aquatic Chemistry. New York, John Wiley & Sons.

Moss, B. (1980). Ecology of Freshwaters, Blackwell Scientific Publications.

Mouchel, J. M., K. Bentayeb, J. Passerat, K. Ouattara, P. Servais, S. Ayrault, C. Priadi-Rianti, L. Moulin, C. Gourlay, E. Uher, E. Moureau-Guigon, P. Labadie, M. J. Teil, T. Dinh, F. Tamtam, K. Tlili, M. Blanchard, J. Eurin, F. Alliot, A. Desportes, C. Bourges and M. Chevreuil (2008). Influence d'un déversement de temps de pluie sur les teneurs dissoutes et particulaires de micro-polluants et les bactéries indicatrices fécales en Seine. Rapport d'activité du PIREN-Seine 2008, Disponible sur www.piren-seine.fr/

Muller, K. (1963). "Diurnal Rhythm in Organic Drift of Gammarus pulex." *Nature* **198**(4882): 806-807.

Musko, I. B., W. Meinel, R. Krause and M. Barlas (1990). "The Impact of Cd and Different Ph on the Amphipod Gammarus-Fossarum Koch (Crustacea, Amphipoda)." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **96**(1): 11-16.

Mylon, S. E., B. S. Twining, N. S. Fisher and G. Benoit (2003). "Relating the speciation of Cd, Cu, and Pb in two Connecticut rivers with their uptake in algae." *Environ Sci Technol* **37**(7): 1261-1267.

Nassiri, Y., P. S. Rainbow, C. Amiard-Triquet, F. Rainglet and B. D. Smith (2000). "Trace-metal detoxification in the ventral caeca of Orchestia gammarellus (Crustacea : Amphipoda)." *Marine Biology* **136**(3): 477-484.

Naylor, C., L. Maltby and P. Calow (1989). "Scope for Growth in Gammarus-Pulex, a Fresh-Water Benthic Detritivore." *Hydrobiologia* **188**: 517-523.

Neff, J. M. (1979). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Sources, fates and biological effects. Barking (Essex, England), Applied Science Publishers Ltd.

Ng, T. Y. T. and W.-X. Wang (2005). "MODELING OF CADMIUM BIOACCUMULATION IN TWO POPULATIONS OF THE GREEN MUSSEL PERNA VIRIDIS." *Environ Toxicol Chem* **24**(9): 2299-2305.

Pagenkopf, G. K. (1983). "Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness." *Environ Sci Technol* **17**(6): 342-347.

Peeters, E. and J. J. P. Gardeniers (1998). "Logistic regression as a tool for defining habitat requirements of two common gammarids." *Freshw Biol* **39**(4): 605-615.

Pellet, B., O. Geffard, T. Kermoal, C. Lacour, C. Gourlay and M. H. Tusseau-Vuillemin (2008). "A model predicting waterborne Cd bioaccumulation in Gammarus pulex: the effects of dissolved organic ligands, calcium and temperature." *Environ Toxicol Chem* **Submitted Jan2008**.

Pelletier, E., P. G. C. Campbell and F. Denizeau (2004). Ecotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement. Québec, Presses de l'Université du Québec.

Penttinen, S., J. Kukkonen and A. Oikari (1995). "The Kinetics of Cadmium in Daphnia magna as Affected by Humic Substances and Water Hardness." *Ecotoxicol Environ Saf* **30**(1): 72-76.

Pernet-Coudrier, B. (2008). Influence des matières organiques dissoutes sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux : cas de la Seine, un système sous forte pression urbaine. Centre d'Enseignement et de Recherche Eau Ville Environnement. Créteil, Université Paris-Est.

Phillips, D. J. H. and P. S. Rainbow (1989). "Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms." *Mar Environ Res* **28**(1-4): 207-210.

Phillips, D. J. H. and P. S. Rainbow (1993). Biomonitoring of trace metals and radionucleides. Biomonitoring of trace aquatic contaminants, Elsevier Applied Science.

Plenet, S. (1995). "Freshwater amphipods as biomonitors of metal pollution in surface and interstitial aquatic systems." *Freshw Biol* **33**(1): 127-137.

Poldoski, J. E. (1979). "Cadmium bioaccumulation assays. Their relationship to various ionic equilibriums in Lake Superior water." *Environ Sci Technol* **13**(6): 701-706.

Postma, J. F., P. van Nugteren and M. B. Buckert-de Jong (1996). "Increased cadmium excretion in metal-

adapted populations of the midge Chironomus riparius (Diptera)." *Environ Toxicol Chem* **15**(3): 332-339.

R Development Core Team (2008). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.

Rainbow, P. S. (1997). "Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans." *Estuar Coast Shelf Sci* **44**(2): 169-175.

Rainbow, P. S. (2002). "Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?" *Environ Pollut* **120**(3): 497-507.

Rainbow, P. S. (2007). "Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity." *Environ Int* **33**(4): 576-582.

Rainbow, P. S., C. Amiard-Triquet, J. C. Amiard, B. D. Smith, S. L. Best, Y. Nassiri and W. J. Langston (1999). "Trace metal uptake rates in crustaceans (amphipods and crabs) from coastal sites in NW Europe differentially enriched with trace metals." *Marine Ecology-Progress Series* **183**: 189-203.

Rainbow, P. S. and W. H. Black (2005). "Cadmium, zinc and the uptake of calcium by two crabs, Carcinus maenas and Eriocheir sinensis." *Aquat Toxicol* **72**(1-2): 45-65.

Rainbow, P. S., A. Geffard, A. Y. Jeantet, B. D. Smith, J. C. Amiard and C. Amiard-Triquet (2004). "Enhanced food-chain transfer of copper from a diet of copper-tolerant estuarine worms." *Marine Ecology-Progress Series* **271**: 183-191.

Rainbow, P. S. and P. G. Moore (1986). "Comparative metal analyses in amphipod crustaceans." *Hydrobiologia* **141**(3): 273-289.

Rainbow, P. S. and S. L. White (1989). "Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle." *Hydrobiologia* **174**(3): 245-262.

Rand, G. M. (1995). Fundamentals Of Aquatic Toxicology.

Rand, G. M., P. G. Wells and L. S. McCarthy (1995). Chapter1 : Introduction to aquatic toxicology. Fundamentals Of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate And Risk Assessment. Florida International University, Miami, Florida, USA.

Rawer-Jost, C., B. Kappus, J. Böhmer, W. Jansen and H. Rahmann (1998). "Upstream movements of benthic macroinvertebrates in two different types of fishways in southwestern Germany." *Hydrobiologia* **391**(1): 47-61.

Reinfelder, J. R. and N. S. Fisher (1991). "The Assimilation of Elements Ingested by Marine Copepods." *Science* **251**(4995): 794-796.

Reinfelder, J. R., N. S. Fisher, S. N. Luoma, J. W. Nichols and W. X. Wang (1998). "Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model approach." *Sci Total Environ* **219**(2-3): 117-135.

Reinfelder, J. R., W. X. Wang, S. N. Luoma and N. S. Fisher (1997). "Assimilation efficiencies and turnover rates of trace elements in marine bivalves: a comparison of oysters, clams and mussels." *Marine Biology* **129**(3): 443-452.

Richter, S. (2002). Einfluss der Aufnahmewege auf die Toxikokinetik von Terbutryn und Benzo[a]pyren bei drei benthischen Invertebraten. Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften. Dresden, TU Dresden. **phD thesis:** 142.

Richter, S. and R. Nagel (2007). "Bioconcentration, biomagnification and metabolism of 14C-terbutryn and 14C-benzo[a]pyrene in Gammarus fossarum and Asellus aquaticus." *Chemosphere* **66**(4): 603-610.

Ritterhoff, J., G. P. Zauke and R. Dallinger (1996). "Calibration of the estuarine amphipods, Gammarus zaddachi Sexton (1912), as biomonitors: Toxicokinetics of cadmium and possible role of inducible metal-binding proteins in Cd detoxification." *Aquat Toxicol* **34**(4): 351-369.

Roditi, H. A. and N. S. Fisher (1999). "Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels." *Limnol Oceanogr* **44**(7): 1730-1749.

Rollin, C., J. C. Boisson, D. Grange and A. Fournier (2002). "Impacts of Highway Pavement Runoff on the Physico-chemical and Biological Quality of Suburban Streams " *Bulletin des Laboratoires des Ponts et Chaussées*(236): 73-83.

Scally, S., W. Davison and H. Zhang (2003). "In situ measurements of dissociation kinetics and labilities of metal complexes in solution using DGT." *Environ Sci Technol* **37**(7): 1379-1384.

Schlekat, C. E., A. W. Decho and G. T. Chandler (2000). "Bioavailability of particle-associated silver, cadmium, and zinc to the estuarine amphipod Leptocheirus plumulosus through dietary ingestion." *Limnol Oceanogr* **45**(1): 11-21.

Schulz, R. and M. Liess (1999). "Validity and ecological relevance of an active in situ bioassay using Gammarus pulex and Limnephilus lunatus." *Environ Toxicol Chem* **18**(10): 2243-2250.

Shutes, R. B. E., J. B. Ellis, D. M. Revitt and A. D. Bascombe (1991). The Biological Assessment Of Metal Impacts On Receiving Water Quality. IAHS, Vienna.

Shutes, R. B. E., J. B. Ellis, D. M. Revitt and A. D. Bascombe (1993). The Use Of Freshwater Invertebrates For Assessment of Metal Pollution in Urban Receiving Water. Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. R. Dallinger and P. S. Rainbow, CRC Press.

Sigg, L., F. Black, J. Buffle, J. Cao, R. Cleven, W. Davison, J. Galceran, P. Gunkel, E. Kalis, D. Kistler, M. Martin, S. Noel, Y. Nur, N. Odzak, J. Puy, W. vanRiemsdijk, E. Temminghoff, M. L. Tercier-Waeber, S. Toepperwien, R. M. Town, E. Unsworth, K. W. Warnken, L. Weng, H. Xue and H. Zhang (2006). "Comparison of Analytical Techniques for Dynamic Trace Metal Speciation in Natural Freshwaters." *Environ Sci Technol* **40**(6): 1934-1941.

Simkiss, K. and M. G. Taylor (2001). "Trace element speciation at cell membranes: aqueous, solid and lipid phase effects." *J Environ Monit* **3**(1): 15-21.

Slaveykova, V. I. and K. J. Wilkinson (2005). "Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model." *Environ Chem* **2**(1): 9-24.

Smokorowski, K. E., D. C. Lasenby and R. D. Evans (1998). "Quantifying the uptake and release of cadmium and copper by the opossum shrimp Mysis relicta preying upon the cladoceran Daphnia magna using stable isotope tracers." *Can J Fish Aquat Sci* **55**(4): 909-916.

Sokolowski, A., M. Wolowicz and H. Hummel (2001). "Distribution of dissolved and labile particulate trace metals in the overlying bottom water in the Vistula River plume (southern Baltic Sea)." *Mar Pollut Bull* **42**(10): 967-980.

Stephenson, M. and G. L. Mackie (1989a). "A laboratory study of the effects of waterborne cadmium, calcium, and carbonate concentrations on cadmium concentrations in Hyalella azteca (Crustacea: Amphipoda)." *Aquat Toxicol* **15**(1): 53-62.

Stephenson, M. and G. L. Mackie (1989b). "Net cadmium flux in Hyalella azteca (crustacea: amphipoda) populations from five central Ontario lakes." *Sci Total Environ* **87-88**: 463-475.

Stevenson, F. J. (1982). Humus Chemistry: Genesis, composition, reactions. New York, Wiley-Interscience.

Stuhlbacher, A. and L. Maltby (1992). "Cadmium Resistance in Gammarus-Pulex (L)." *Arch Environ Contam Toxicol* **22**(3): 319-324.

Stumm, W. and J. J. Morgan (1996). Aquatic Chemistry, Wiley-Interscience publication.

Tachet, H., M. Bournaud, P. Richoux and P. Usseglio-Polatera (2000). Invertébrés d'eau douce : Systématique, biologie, écologie. Paris.

Tan, Q.-G. and W.-X. Wang (2008). "The influences of ambient and body calcium on cadmium and zinc accumulation in Daphnia magna." *Environ Toxicol Chem* **27**(7): 1605-1613.

Taylor, E. J., E. M. Rees and D. Pascoe (1994). "Mortality and a drift-related response of the freshwater amphipod Gammarus pulex (L.) exposed to natural sediments, acidification and copper." *Aquat Toxicol* **29**(1-2): 83-101.

Templeton, D. M., F. Ariese, R. Cornelis, L. G. Danielsson, H. Muntau, H. P. Van Leeuwen and R. Lobinski (2000).

"Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)." *Pure Appl Chem* **72**(8): 1453-1470.

Tessier, A., P. G. C. Campbell and M. Bisson (1979). "Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals." *Anal Chem* **51**(7): 844-851.

Thévenot, D. R., M. Meybeck, A. Chesterikoff and M. Chevreuil (1998). Métaux : sources multiples et accumulation. La Seine en son bassin. M. Meybeck, G. de Marsily and E. Fustec. Paris, Elsevier.

Thurman, E. M. and R. L. Malcolm (1981). "Preparative isolation of aquatic humic substances." *Environ Sci Technol* **15**(4): 463-466.

Town, R. M. and M. Filella (2000a). "A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters." *Aquatic Sciences* **62**(3): 252-295.

Town, R. M. and M. Filella (2000b). "Dispelling the myths: Is the existence of L1 and L2 ligands necessary to explain metal ion speciation in natural waters?" *Limnol Oceanogr* **45**(6): 1341-1357.

Tusseau-Vuillemin, M.-H., R. Gilbin and M. Taillefert (2003). "A dynamical model to characterize labile metal complexes collected with Diffusion Gradient in Thin films devices." *Environ Sci Technol* **37**(8): 1645-1652.

Tusseau-Vuillemin, M. H., R. Buzier, C. Martin dit Mériadec, I. Chardon, F. Elbaz-Poulichet, J. L. Seidel, J. M. Mouchel and G. Varrault (2004a). Du réseau à la rivière et de la Marne à Andrésy : métaux labiles, dissous et particulaires. Rapport du Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine. Paris, PIREN-Seine.

Tusseau-Vuillemin, M. H., R. Gilbin, E. Bakkaus and J. Garric (2004b). "Performance of diffusion gradient in thin films to evaluate the toxic fraction of copper to Daphnia magna." *Environ Toxicol Chem* **23**(9): 2154-2161.

Tusseau-Vuillemin, M. H., C. Gourlay, C. Lorgeoux, J. M. Mouchel, R. Buzier, R. Gilbin, J. L. Seidel and F. Elbaz-Poulichet (2007). "Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin." *Sci Total Environ* **375**(1-3): 244-256.

Unsworth, E. R., K. W. Warnken, H. Zhang, W. Davison, F. Black, J. Buffle, J. Cao, R. Cleven, J. Galceran, P. Gunkel, E. Kalis, D. Kistler, H. P. vanLeeuwen, M. Martin, S. Noel, Y. Nur, N. Odzak, J. Puy, W. vanRiemsdijk, L. Sigg, E. Temminghoff, M. L. Tercier-Waeber, S. Toepperwien, R. M. Town, L. Weng and H. Xue (2006). "Model Predictions of Metal Speciation in Freshwaters Compared to Measurements by In Situ Techniques." *Environ Sci Technol* **40**(6): 1942-1949.

Van Ginneken, L., L. Bervoets and R. Blust (2001). "Bioavailability of Cd to the common carp, Cyprinus carpio, in the presence of humic acid." *Aquat Toxicol* **52**(1): 13-27.

Van Hattum, B., P. de Voogt, L. van den Bosch, N. M. van Straalen, E. N. G. Joosse and H. Govers (1989). "Bioaccumulation of cadmium by the freshwater isopod Asellus aquaticus (L.) from aqueous and dietary sources." *Environ Pollut* **62**(2): 129-151.

Van Hattum, B., G. Korthals, N. M. Van Straalen, H. A. J. Govers and E. N. G. Joosse (1993). "Accumulation patterns of trace metals in freshwater isopods in sediment bioassays--Influence of substrate characteristics, temperature and pH." *Water Res* **27**(4): 669-684.

Voets, J., L. Bervoets and R. Blust (2004). "Cadmium Bioavailability and Accumulation in the Presence of Humic Acid to the Zebra Mussel, <i>Dreissena polymorpha</i>." *Environ Sci Technol* **38**(4): 1003-1008.

Wallace, W. G. and S. N. Luoma (2003). "Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM)." *Marine Ecology-Progress Series* **257**: 125-137.

Wang, W. X. and N. S. Fisher (1999). "Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: A synthesis." *Environ Toxicol Chem* **18**(9): 2034-2045.

Wang, W. X., N. S. Fisher and S. N. Luoma (1996a). "Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel Mytilus edulis." *Marine Ecology-Progress Series* **140**(1-3): 91-113.

Wang, W. X. and C. H. Ke (2002). "Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods." *Aquat Toxicol* **56**(3): 153-165.

Wang, W. X. and P. S. Rainbow (2005). "Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrates." *Ecotoxicol Environ Saf* **61**(2): 145-159.

Wang, X., S. Harada, M. Watanabe, H. Koshikawa and H. J. Geyer (1996b). "Modelling the bioconcentration of hydrophobic organic chemicals in aquatic organisms." *Chemosphere* **32**(9): 1783-1793.

Warnken, K. W., H. Zhang and W. Davison (2006). "Accuracy of the Diffusive Gradients in Thin-Films Technique: Diffusive Boundary Layer and Effective Sampling Area Considerations." *Anal Chem* **78**(11): 3780-3787.

Weeks, J. M. and P. S. Rainbow (1994). "Interspecific Comparisons of Relative Assimilation Efficiencies for Zinc and Cadmium in an Ecological Series of Talitrid Amphipods (Crustacea)." *Oecologia* **97**(2): 228-235.

Werner, I. (2000). "Faecal pellet production by Arctic under-ice amphipods - transfer of organic matter through the ice/water interface." *Hydrobiologia* **426**(1-3): 89-96.

White, S. L. and P. S. Rainbow (1985). "On the metabolic requirements for copper and zinc in molluscs and crustaceans." *Mar Environ Res* **16**(3): 215-229.

Wilding, J. and L. Maltby (2006). "Relative toxicological importance of aqueous and dietary metal exposure to a freshwater crustacean: implications for risk assessment." *Environ Toxicol Chem* **25**(7): 1795-1801.

Wright, D. A. (1980). "Cadmium and calcium interactions in the freshwater amphipod Gammarus pulex." *Freshw Biol* **10**(2): 123-133.

Xu, Q. and D. Pascoe (1993). "The bioconcentration of zinc by Gammarus pulex (L.) and the application of a kinetic model to determine bioconcentration factors." *Water Res* **27**(11): 1683-1688.

Xu, Q. and D. Pascoe (1994). "The importance of food and water as sources of zinc during exposure of Gammarus pulex (amphipoda)." *Arch Environ Contam Toxicol* **26**(4): 459-465.

Yu R-Q, Wang W-X. 2004. Biokinetics of cadmium, selenium, and zinc in freshwater alga Scenedesmus obliquus under different phosphorus and nitrogen conditions and metal transfer to Daphnia magna. *Environ Pollut* 129:443-456.

Zaugg, C. (1997). Vernetzung bei Kleinwasserkraftwerken: Biologisches Kontinuum der Gewässer erhalten, Untersuchungen über das Gewässerkontinuum für Fische und Kleinlebewesen. Ofen. Berne**:** 88.

Zauke, G.-P. (1982). "Cadmium in Gammaridae (amphipoda: crustacea) of the rivers Werra and Weser--II : Seasonal variation and correlation to temperature and other environmental variables." *Water Res* **16**(6): 785-792.

Zauke, G. P., R. Vonlemm, H. G. Meurs and W. Butte (1995). "Validation of Estuarine Gammarid Collectives (Amphipoda, Crustacea) as Biomonitors for Cadmium in Semi-Controlled Toxicokinetic Flow-through Experiments." *Environ Pollut* **90**(2): 209-219.

Zhang, H. and W. Davison (2000). "Direct In Situ Measurements of Labile Inorganic and Organically Bound Metal Species in Synthetic Solutions and Natural Waters Using Diffusive Gradients in Thin Films." *Anal Chem* **72**(18): 4447-4457.